



**Tomás Costa Ravasco**

Licenciado em Engenharia Química e Bioquímica

## **Validação do Método Cromatográfico de Análise de 2,4,6-Tricloroanisol**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Ana Matos, Diretora da Qualidade, UI Equipar, Amorim & Irmãos, S.G.P.S., S.A.

Co-orientador: Mário Eusébio, Professor Auxiliar, FCT/UNL

**Júri:**

**Presidente:** Professora Maria Isabel Coelho, Professora Auxiliar na  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova  
de Lisboa

**Arguente:** Doutor Miguel Freire de Albuquerque Ferreira Cabral,  
Diretor de Investigação & Desenvolvimento, Amorim &  
Irmãos S.G.P.S., S.A.

**Vogal:** Engenheira Ana Maria Fernandes de Matos, Diretora de  
Qualidade, UI Equipar, Amorim & Irmãos S.G.P.S., S.A.



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março de 2015**



# **Validação do Método Cromatográfico de Análise de 2,4,6-Tricloroanisol**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Ana Matos, Diretora da Qualidade, UI Equipar, Amorim & Irmãos, S.G.P.S., S.A.  
Co-orientador: Mário Eusébio, Professor Auxiliar, FCT/UNL

**Março de 2015**

## **Validação do método cromatográfico de análise de 2,4,6-tricloroanisol**

Copyright © **Tomás Costa Ravasco**, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

# AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à orientadora da minha dissertação, a Engenheira Ana Matos, e ao meu co-orientador, Professor Mário Eusébio por me terem dado a oportunidade de realizar este estágio no laboratório de qualidade da UI Equipar e pelo seu apoio e disponibilidade constantes prestados ao longo do estágio. Agradeço também a todos os membros da equipa do laboratório de qualidade, João Morgado, Marina Célia, Amélia Benito e Anabela Rodrigues por me terem recebido de forma tão simpática, pela grande disponibilidade de me integrarem no grupo e pela constante boa disposição.

A todos os colaboradores do departamento de I&D da Amorim & Irmãos, em especial à Engenheira Ana Malheiro, que tanto me ajudou ao longo de toda a dissertação.

Aos meus amigos e colegas de faculdade pela frequente companhia e amizade.

Ao Valter Claudina pelo apoio e companhia em todos os fins-de-semana de estudo.

Ao Zé e Tota por me terem recebido tão bem em sua casa.

À Inês por ser quem é.

E aos meus pais por toda a minha formação académica e pessoal.



## RESUMO

O trabalho realizado foi desenvolvido no âmbito de um estágio curricular de seis meses efetuado no laboratório de qualidade da Unidade Industrial Equipar, Amorim & Irmãos S.G.P.S., S.A..

O objetivo proposto para estágio foi a validação do método cromatográfico para determinação de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) seguido no laboratório de qualidade da unidade.

A contaminação do vinho por haloanisóis – erroneamente chamado de “sabor a rolha” – é um sério problema para a indústria vitivinícola e corticeira, sendo o principal contaminante o 2,4,6–tricloroanisol (TCA).

O método a validar, para a análise de TCA, recorre a cromatografia gasosa, com microextração sólida no espaço de cabeça (SPME), acoplado a um detetor de captura de eletrões. Foi utilizado como padrão interno o 2,3,6-tricloroanisol (TCA<sub>3</sub>). O método estudado usa uma coluna de polidimetilsiloxano (PDMS), tem como matriz uma solução hidroalcoólica a 12%. O método foi validado para dois cromatógrafos, ECD1 e ECD2.

No estudo da linearidade verificou-se, para ambos os cromatógrafos, o método é linear com  $r^2 > 0,9990$ . Os limiares analíticos de deteção foram de 0,34 e 0,29 ppt para o ECD1 e ECD2, respetivamente. Os limiares analíticos de quantificação foram de 0,55 e 0,43 ppt, para o ECD1 e ECD2, respetivamente. Na repetibilidade do método obteve-se um CV < 10% e os limites de repetibilidade não foram ultrapassados. Na precisão intermédia os limites de precisão intermédia não são ultrapassados. Na exatidão, obteve-se uma recuperação média entre 95% e 115%. A gama de trabalho encontra-se bem definida. No teste da robustez concluiu-se que o método é inconsistente.

Foi calculada a incerteza global associada ao resultado verificando-se que as incertezas que mais contribuem para a incerteza do método são a incerteza associada à pesagem do TCA (32,22%) aquando da preparação da solução-mãe, à precisão (25,65%) e à exatidão (23,64%), perfazendo cerca de 83% da incerteza. A incerteza expandida, calculada para um nível de confiança de 97,5%, é de 13,78% do resultado obtido.

**Palavras-chave:** 2,4,6-tricloroanisol, validação, cromatografia gasosa, incerteza global.





# ABSTRACT

This master's thesis was developed in an internship, over a period of six months, in the quality laboratory of the UI-Equipar, Amorim & Irmãos S.G.P.S., S.A..

The objective proposed was to validate the chromatographic method for the analysis of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) followed by the quality laboratory.

The wine's contamination by chloroanisoles – wrongfully called “cork taint” – is a serious problema for the wine and cork industry, being the major contaminant 2,4,6-trichloroanisole.

The analytical method for the analysis of TCA uses headspace microextraction and gas chromatography with electron-capture detection. As internal standard it was used 2,3,6-trichloroanisole (TCA<sub>3</sub>). The method involves the use of fibres coated with polydimethylsiloxane (PDMS) and has as a matrix water-alcohol solution 12%.

In the linearity study it was verified that, for both the ECDs, the method was linear with correlation coefficients  $r^2 > 0.9990$ . The detection limits were of 0.34 and 0.29 ppt, for ECD1 and ECD2, respectively. The quantification limites were of 0.55 and 0.43 ppt, for ECD1 and ECD2, respectively. In the repeatability test the coefficient of variation were inferior than 10% and the repeatability limits were not exceeded. In the intermediate precision, its limits were not exceeded. The results for the accuracy test, the average recovery were between 95 and 115%. The working range is well defined, since the method is precise, accurate and there are no significant differences between the variances of the two extreme points of the calibration curve. The method showed it self inconsistent for the robustness test.

The global uncertainty associated with the result was estimated also. The uncertainties that most contribute to the global uncertainty were the uncertainty associated with the weighing of the TCA when preparing the stock solution (32.22%), with the precision (25.65%) and with accuracy (23.64%), making up about 83% of the global uncertainty. The expanded uncertainty, estimated on a confidence level of 97.5%, is 13.78% of the obtained result.

**Keywords:** 2,4,6-trichloroanisole, validation, gas chromatography, global uncertainty.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Enquadramento e Motivação .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. O Sobreiro e a Cortiça .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Qualidade da Cortiça.....	6
1.2.2. Calibre da Cortiça.....	7
1.2.3. Contaminantes .....	8
<b>1.3. Cromatografia .....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Classificação de Métodos Cromatográficos .....	19
1.3.2. Componentes da Cromatografia Gasosa.....	20
1.3.3. Detetor por Captura Eletrónica (ECD) .....	21
<b>1.4. Microextração em Fase Sólida (SPME) .....</b>	<b>23</b>
1.4.1. Fase Estacionária .....	26
<b>1.5. Determinações Quantitativas .....</b>	<b>28</b>
1.5.1. Integração da Área do Pico .....	28
1.5.2. Integração Computacional .....	29
1.5.3. Métodos de Avaliação.....	29
<b>1.6. Análise Sensorial .....</b>	<b>30</b>
<b>1.7. Validação do Método Cromatográfico .....</b>	<b>32</b>
1.7.1. Especificidade.....	32
1.7.2. Seletividade .....	33
1.7.3. Gama de Trabalho .....	34
1.7.4. Linearidade.....	35
1.7.5. Limiares Analíticos .....	37
1.7.6. Precisão .....	40
1.7.7. Exatidão .....	43
1.7.8. Robustez .....	44
<b>1.8. Incerteza de Medição .....</b>	<b>45</b>
1.8.1. Procedimentos da Avaliação da Incerteza.....	47
1.8.2. Abordagem “Passo a Passo” Combinada com Dados de Validação .....	48
<b>1.9. Empresa – Corticeira Amorim, S.G.P.S., S.A. ....</b>	<b>60</b>
1.9.1. Unidade Industrial Equipar .....	61
1.9.2. Importância da Qualidade para a Amorim & Irmãos .....	65
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
<b>2.1. Material e Reagentes.....</b>	<b>67</b>
2.1.1. Material .....	67
2.1.2. Reagentes e Químicos .....	67

2.1.3. Preparação das Soluções Padrão .....	68
<b>2.2. Metodologia.....</b>	<b>68</b>
2.2.1. Objetivo .....	68
2.2.2. Macerações .....	69
2.2.3. Preparação das Amostras de Macerado .....	69
2.2.4. Consumíveis .....	70
2.2.5. Condições Operatórias.....	70
2.2.6. Parâmetros Experimentais .....	71
<b>2.3. Validação do Método – Procedimentos .....</b>	<b>75</b>
2.3.1. Linearidade.....	75
2.3.2. Limiares Analíticos.....	75
2.3.3. Gama de Trabalho .....	75
2.3.4. Precisão .....	75
2.3.5. Robustez .....	76
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
3.1. Especificidade e Seletividade.....	79
3.2. Linearidade .....	80
3.3. Limiares Analíticos.....	91
3.3.1. Através do Desvio Padrão Residual da Curva de Calibração .....	92
3.3.2. Através do Desvio Padrão da Amostra.....	95
3.3.3. Através da Razão Sinal: Ruído (S/N) .....	96
3.3.4. Comparação.....	96
3.4. Precisão .....	97
3.4.1. Repetibilidade .....	98
3.4.2. Reprodutibilidade.....	99
3.4.3. Precisão Intermédia.....	101
3.5. Exatidão.....	102
3.6. Gama de Trabalho.....	104
3.7. Robustez.....	104
3.8. Incerteza Global Associada ao Resultado .....	107
3.8.1. Especificação do Mensurando .....	107
3.8.2. Identificação das Componentes de Incerteza.....	108
3.8.3. Quantificação das Componentes de Incerteza .....	108
3.8.4. Incerteza Padrão Combinada.....	116
3.8.5. Incerteza Expandida .....	117
3.8.6. Expressão dos Resultados .....	118
3.9. Potência de Aquisição.....	118
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>5. TRABALHO FUTURO .....</b>	<b>124</b>

<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>127</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>131</b>
<b>7.1. Anexo A – Resultados dos Testes de Linearidade.....</b>	<b>131</b>
7.1.1. <b>Anexo A.1.1.</b> Resultados do primeiro teste de linearidade para o ECD1.....	131
7.1.2. <b>Anexo A.1.2.</b> Resultados do primeiro teste de linearidade para o ECD2.....	131
7.1.3. <b>Anexo A.2.1.</b> Resultados do segundo teste de linearidade para o ECD1.....	132
7.1.4. <b>Anexo A.2.2.</b> Resultados do segundo teste de linearidade para o ECD2.....	132
7.1.5. <b>Anexo A.3.1.</b> Resultados do terceiro teste de linearidade para o ECD1.....	133
7.1.6. <b>Anexo A.3.2.</b> Resultados do terceiro teste de linearidade para o ECD2.....	133
7.1.7. <b>Anexo A.4.1.</b> Resultados do quarto teste de linearidade para o ECD1.....	133
7.1.8. <b>Anexo A.5.1.</b> Resultados do quinto teste de linearidade para o ECD1 .....	134
<b>7.2. Anexo B – Resultados dos Testes dos Limiares Analíticos Através do Desvio Padrão da Amostra .....</b>	<b>134</b>
<b>7.3. Anexo C – Resultados dos Testes da Precisão Intermédia .....</b>	<b>135</b>
<b>7.4. Anexo D – Resultados dos Testes da Robustez .....</b>	<b>135</b>
7.4.1. <b>Anexo D.1.</b> Resultados do primeiro teste de robustez .....	135
7.4.2. <b>Anexo D.2.</b> Resultados do segundo teste de robustez .....	136



# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – a) Percentagem da área mundial de montado; b) Percentagem de produção mundial de produção de cortiça.....	1
Figura 1.2 - Camadas da cortiça.....	5
Figura 1.3 - Representação esquemática da formação da cortiça: A – Entrecasco após o descortiçamento; B – 30 dias depois; C – no fim do Outono; D – 9 anos depois.....	5
Figura 1.4 - Biossíntese de 2,4,6-tricloroanisol (TCA). ....	13
Figura 1.5 - Esquema de separação de compostos de uma amostra, numa coluna cromatográfica.....	17
Figura 1.6 - Esquema das interações dos compostos com o revestimento da coluna cromatográfica.....	18
Figura 1.7 - Representação da diluição de compostos com diferentes tempos de retenção. ....	19
Figura 1.8 - Representação esquemática dos componentes principais da cromatografia gasosa. ....	20
Figura 1.9 - Representação de um cromatograma.....	22
Figura 1.10 - Etapas de um ciclo de SPME. a) e b) Sorção: penetração da agulha e exposição à amostra. c) Extração direta. d) Extração em headspace. e) e f) dessorção da fibra no injetor do cromatógrafo gasoso.....	25
Figura 1.11 - Exemplo do sistema de uma agulha SPME.....	28
Figura 1.12 - Roda dos Aromas.....	31
Figura 1.13 - Exemplo de valores de um teste de recuperação de TCA. ....	34
Figura 1.14 - Distinção entre Precisão e Exatidão.....	46
Figura 1.15 - Organigrama da empresa Corticeira Amorim S.G.P.S., S.A.....	61
Figura 1.16 - Processo de produção da rolha Aglomerada.....	62
Figura 1.17 - Processo de produção da rolha Twin Top®. ....	63
Figura 1.18 - Processo de produção da rolha Advantec® e Advantec Colours®.....	64
Figura 2.1 - Resultados da influência do tempo de extração na quantidade de analito extraído.....	73
Figura 2.2 - Resultados da influência do tempo de extração na quantidade de analito extraído.....	73
Figura 2.3 – Influência da potência de aquisição na forma do pico. ....	74
Figura 3.1 - Cromatograma de TCA com uma concentração de 10 ppt.....	79
Figura 3.2 - Curva de calibração obtida na réplica 5 do ECD2. ....	82
Figura 3.3 - Curva de calibração obtida na réplica 11 do ECD1.....	82
Figura 3.4 - Cromatograma do ECD1, com padrão de 2 ppt.....	96
Figura 3.5 - Cromatograma do ECD2, com padrão de 2 ppt.....	97
Figura 3.6 - Valores de z-score obtidos pelos doze laboratórios, da amostra A do ensaio interlaboratorial 107, realizado a 16 de janeiro de 2015. ....	101
Figura 3.7 - Diagrama Causa-Efeito para a determinação de tricloroanisol. ....	108
Figura 3.8 - Contribuições de cada Incerteza Padrão para a Incerteza Expandida. ....	117
Figura 3.9 - Variação da linha de base e da largura dos picos com potência de aquisição de 10 e 5 Hz, no ECD1. ....	119
Figura 3.10 - Variação da linha de base e da largura dos picos com potência de aquisição de 10 e 5 Hz, no ECD2. ....	119





## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Constituição química da cortiça segundo diferentes autores.....	4
Tabela 1.2 - Calibres da cortiça segundo a norma portuguesa NP 298, 1993. ....	7
Tabela 1.3 – Teores haloanisóis em várias matrizes, segundo o estudo realizado pelo Geisenheim Research Center Section of Microbiology and Biochemistry. ....	9
Tabela 1.4 - Limite de Detecção Humana (L.D.H.), de vários compostos contaminantes, em diferentes matrizes. ....	11
Tabela 1.5 - Principais fases estacionárias utilizadas em cromatografia gasosa. ....	27
Tabela 1.6 - Desvios organoléticos de vários compostos contaminantes e respetivos limites de perceção e reconhecimento, em água e vinho branco.....	31
Tabela 1.7 - Parâmetros estudados para a validação de métodos, segundo diferentes guias. ....	33
Tabela 1.8 - Etapas para a quantificação de incertezas, de acordo com o guia.....	47
Tabela 1.9 - Tipos de distribuição e sua aplicação relativamente à avaliação da incerteza do tipo B.....	51
Tabela 1.10 - Diâmetros do granulado produzido na UI Equipar.....	62
Tabela 2.1 - Volumes para a preparação de cada uma das seis concentrações da curva de calibração.....	68
Tabela 2.2 - Rampa de temperatura do forno.....	70
Tabela 2.3 - Resultados do estudo realizado para aferir a quantidade de sal adicionado pelo dispensador, em cada vial. ....	72
Tabela 2.4 - Ensaio realizado no estudo da robustez do método. ....	77
Tabela 3.1 - Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e quantificação para ambos os cromatógrafos. ....	81
Tabela 3.2 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD1.....	82
Tabela 3.3 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD2.....	82
Tabela 3.4 - Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e quantificação para ambos os cromatógrafos. ....	84
Tabela 3.5 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD1.....	85
Tabela 3.6 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD2.....	85
Tabela 3.7 - Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e quantificação para ambos os cromatógrafos. ....	86
Tabela 3.8 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD1.....	87
Tabela 3.9 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD2.....	87
Tabela 3.10 - Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e quantificação para o ECD1.....	88
Tabela 3.11 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação.....	88

Tabela 3.12 - Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e quantificação para o ECD1.....	89
Tabela 3.13 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação.....	90
Tabela 3.14 - Alteração de parâmetros como o nova coluna, corte de coluna ou recalibração entre testes.....	91
Tabela 3.15 - Curvas de calibração para cada teste realizado.....	91
Tabela 3.16 - Valores do coeficiente de correlação de cada curva de calibração, desvio padrão residual da respetiva reta e limites de deteção e de quantificação, para cada ECD.....	92
Tabela 3.17 - Valores do coeficiente de correlação de cada curva de calibração, desvio padrão residual da respetiva reta e limites de deteção e de quantificação, para o ECD1.....	93
Tabela 3.18 - Valores do coeficiente de correlação de cada curva de calibração, desvio padrão residual da respetiva reta e limites de deteção e de quantificação, para o ECD2.....	94
Tabela 3.19 - Valores do coeficiente de correlação de cada curva de calibração, desvio padrão residual da respetiva reta e limites de deteção e de quantificação, para o ECD1.....	95
Tabela 3.20 - Resultados das amostras fortificadas com concentrações vestigiais, e limiares analíticos. ....	96
Tabela 3.21 - Resultados dos limiares analíticos, calculados através do método do desvio padrão residual da curva de calibração e através do método do desvio padrão da amostra, para ambos os cromatógrafos. ....	97
Tabela 3.22 - Valores de concentração de TCA obtidos nos ensaios de repetibilidade, valor de limite de repetibilidade e coeficiente de variação, para cada nível de concentração. ....	98
Tabela 3.23 - Valores de concentração de TCA obtidos nos ensaios de repetibilidade, valor de limite de repetibilidade e coeficiente de variação, para cada nível de concentração. ....	99
Tabela 3.24 - Resultados dos ensaios interlaboratoriais e respetivo z-score, para ambos os cromatógrafos. ....	100
Tabela 3.25 - Resultados dos testes de precisão obtidos sob condições de precisão intermédia, desvios padrão ( $S_{pi}$ ) e limites de precisão intermédia ( $r_{pi}$ ). ....	102
Tabela 3.26 - Resultados dos ensaios de recuperação para o ECD1 (valores do 5º teste de linearidade).....	103
Tabela 3.27 - Resultados dos ensaios de recuperação para o ECD2 (valores do 3º teste de linearidade).....	103
Tabela 3.28 - Resultados do teste de análise de homogeneidade de variâncias dos padrões 0,50 e 20 ppt, do ECD1 e ECD2.....	104
Tabela 3.29 - Resultados cromatográficos da primeira série de ensaios do teste da robustez do método. ....	105
Tabela 3.30 - Resultados da primeira série de ensaios do teste da robustez do método..	106
Tabela 3.31 - Resultados cromatográficos da segunda série de ensaios do teste da robustez do método. ....	106
Tabela 3.32 - Resultados da segunda série de ensaios do teste da robustez do método..	107
Tabela 3.33 - Valores de incerteza padrão associados a cada composto da molécula de TCA. ....	109
Tabela 3.34 - Incerteza padrão associada à massa molar de TCA. ....	109
Tabela 3.35 - Incerteza padrão associada à pureza de TCA. ....	109
Tabela 3.36 - Incerteza padrão associada à pesagem de TCA. ....	110
Tabela 3.37 - Incerteza padrão associada à medição de volume na preparação da solução-mãe. ....	111

Tabela 3.38 - Incerteza padrão associadas às medições de volume e diluições. ....	111
Tabela 3.39 - Incertezas associadas à preparação da Amostra. ....	112
Tabela 3.40 - Resultados das réplicas da curva de calibração do cromatógrafo ECD1.....	112
Tabela 3.41 - Declive e ordenada na origem da curva de calibração e respetiva incerteza associada .....	112
Tabela 3.42 - Resultados das réplicas da curva de calibração do cromatógrafo ECD2.....	113
Tabela 3.43 - Declive e ordenada na origem da curva de calibração do cromatógrafo ECD2 e respetiva incerteza associada.....	113
Tabela 3.44 - Resultados da precisão intermédia, para cada cromatógrafo, e respetivo desvio-padrão relativo.....	114
Tabela 3.45 - Incertezas padrão associadas à precisão, de cada cromatógrafo.....	114
Tabela 3.46 - Resultados dos ensaios de recuperação para cada concentração, no cromatógrafo 1, e respetiva incerteza associada.....	115
Tabela 3.47 - Resultados dos ensaios de recuperação para cada concentração, no cromatógrafo 1, e respetiva incerteza associada.....	115
Tabela 3.48 - Incertezas padrão dos parâmetros identificados e quantificáveis que contribuem para a incerteza do método.....	116
Tabela 3.49 - Incertezas padrão combinadas de cada um dos níveis de concentração da curva de calibração.....	117
Tabela 3.50 - Incertezas padrão combinadas de cada um dos níveis de concentração da curva de calibração, para um fator $k=2,2622$ . ....	118
Tabela 7.1 - Resultados do primeiro teste de linearidade para o ECD1.....	131
Tabela 7.2 - Resultados do primeiro teste de linearidade para o ECD2.....	131
Tabela 7.3 - Resultados do segundo teste de linearidade para o ECD1.....	132
Tabela 7.4 - Resultados do segundo teste de linearidade para o ECD2.....	132
Tabela 7.5 - Resultados do terceiro teste de linearidade para o ECD1.....	133
Tabela 7.6 - Resultados do terceiro teste de linearidade para o ECD2.....	133
Tabela 7.7 - Resultados do quarto teste de linearidade para o ECD1. ....	133
Tabela 7.8 - Resultados do quinto teste de linearidade para o ECD1. ....	134
Tabela 7.9 - Resultados dos testes dos limiares analíticos através do desvio padrão da amostra .....	134
Tabela 7.10 - Resultados dos testes da precisão intermédia.....	135
Tabela 7.11 - Resultados do primeiro teste de robustez.....	135
Tabela 7.12 - Resultados do segundo teste de robustez.....	136



# LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>TCA</b>	2,4,6-tricloroanisol
<b>TCA<sub>3</sub></b>	2,3,6-tricloroanisol
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i>
<b>SPME</b>	<i>Solid-phase Microextraction</i>
<b>ECD</b>	<i>Electron Capture Detector</i>
<b>UI</b>	Unidade Industrial
<b>CIPR</b>	Código Internacional das Práticas Rolheiras
<b>APCOR</b>	Associação Portuguesa de Cortiça
<b>TeCA</b>	2,3,4,6-tetracloroanisol
<b>PCA</b>	Pentacloroanisol
<b>TBA</b>	2,4,6-tribromoanisol
<b>TCP</b>	2,4,6-triclorofenol
<b>PCP</b>	Pentaclorofenol
<b>RA</b>	Rolha Aglomerada
<b>RN</b>	Rolha Neutrocork
<b>RCT</b>	Rolha Champanhe e Técnica
<b>ROSA</b>	Rate of Optimal Steam Application
<b>CTCOR</b>	Centro Tecnológico da Cortiça
<b>USP</b>	<i>United States Pharmacopeia</i>
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonisation</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>EURACHEM</b>	Guia laboratorial para validação de métodos
<b>USEPA</b>	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
<b>MRC</b>	Materiais de Referência Certificados
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>DVB</b>	Divinilbenzeno
<b>CAR</b>	Carboxeno
<b>PA</b>	Poliacrilato

---



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Enquadramento e Motivação

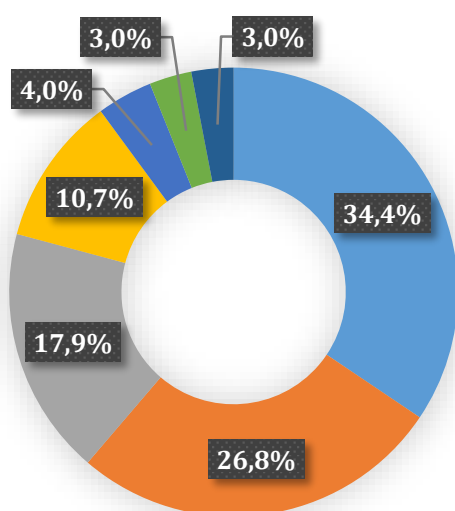
O montado de sobro ocupa uma área mundial de 2.1 milhões de hectares, sendo que Portugal concentra 34% da mesma, correspondente a uma área de cerca de 736 mil hectares, 23% da floresta nacional (Figura 1.1).

A produção mundial da cortiça ascende a 201 mil toneladas por ano, destacando-se Portugal como o líder na produção, com 49,6% e 100 mil toneladas por ano.

Além de líder mundial na produção, Portugal é também líder mundial do sector da cortiça no que toca às exportações. Em 2012, assume uma quota de 64,7%, correspondendo a 845 370 milhões de euros, tendo havido um aumento de dois pontos percentuais em comparação com o ano anterior, seguido por Espanha com 16%. É, ainda, o quarto maior importador mundial de cortiça, que utiliza para transformação e posterior exportação sob a forma de produtos de consumo final, com uma quota de cerca de 10% e 134,6 milhões de euros, no ano de 2013.

Estes fatores fazem com que a indústria da cortiça ocupe um lugar de grande relevância na indústria portuguesa, tendo portanto um grande impacto económico e social.

a) Percentagem da Área de Montado de Sobro



b) Percentagem de Produção Mundial de Cortiça

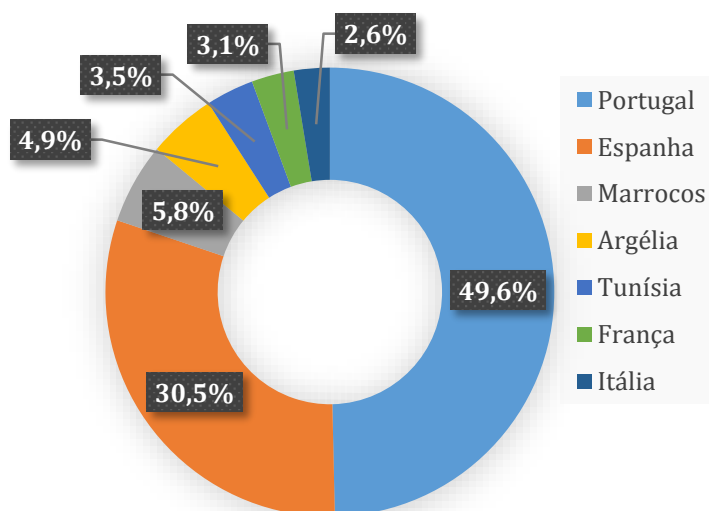


Figura 1.1 – a) Percentagem da área mundial de montado; b) Percentagem de produção mundial de produção de cortiça (APCOR, 2013).

O principal sector de destino dos produtos de cortiça é a indústria vitivinícola que absorve 68,4% de tudo o que é produzido, seguido do sector da construção civil com 31,6%,

onde se incluem os pavimentos, isolamentos e revestimentos, os cubos, placas, folhas, tiras e, ainda, outros produtos de cortiça, como por exemplo para decoração.

Na indústria vitivinícola, a cortiça é utilizada na fabricação de rolhas, usadas na vedação do vinho. O vinho é uma bebida complexa apreciada em termos da sua cor, tonalidade, aroma e sabor. Um dos problemas da alteração de aromas do vinho está relacionado com as rolhas de cortiça. A presença de determinados compostos pode causar a passagem de um gosto desagradável para a bebida, o que representa um importante problema económico não só para a indústria vitivinícola como também para a indústria da cortiça. Segundo (Quercus, 1996), esta contaminação afetou, na Europa, de 0,1 a 10 % de todos os vinhos engarrafados, e é estimada uma perda anual de 10 mil milhões de dólares como resultado desta contaminação (Fuller, 1995). Desde então foram implementados sistemas de controlo e tratamento de cortiça.

Deste modo, a Associação Portuguesa da Cortiça (APCOR), em conjunto com a Confederação Europeia da Cortiça (CELiège), promove, divulga e apoia a implementação do Código Internacional das Práticas Rolheiras (CIPR), com vista a integrar medidas de controlo de qualidade da produção e dos sistemas produtivos, e o respetivo sistema de qualidade, o *Systecode*, que assegura o cumprimento do CIPR.

Além destes, uma vez que as rolhas de cortiça estão em contato direto com um alimento, o cumprimento de rígidas práticas de higiene para impedir a contaminação durante a produção é uma preocupação constante. Para tal existe também a acreditação em matérias como Sistemas de Gestão de Qualidade (ISO 9001), Sistemas de Gestão do Ambiente (ISO 14001), Sistemas de Gestão da Segurança Alimentar (ISO 22000) e HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point* – Análise de Risco e Ponto de Controlo Crítico). Estas normas ISO são atribuídas pela Associação Portuguesa de Certificação (APCER), normas que reconhecem as empresas que adotam padrões elevados de conformidade alimentar com efeitos visíveis na redução ou eliminação dos riscos para a saúde dos consumidores (APCOR, 2013).

Dos vários compostos identificados como responsáveis pelo denominado “gosto a rolha”, o 2,4,6-tricloroanisol (TCA) é dado como o principal composto químico contribuinte para este efeito. O TCA apresenta um limiar de deteção humano bastante baixo (entre 1 e 5 ppt – parte por trilião), pelo que são necessários métodos analíticos extremamente sensíveis para detetar concentrações deste composto com valores no seu limiar de quantificação ou inferiores.

No laboratório da Unidade Industrial Equipar, o controlo do teor de TCA é feito através de cromatografia gasosa, uma técnica de separação de uma amostra em várias frações e posterior medição ou identificação das mesmas.



É nesta área que a presente dissertação se insere.

O objetivo principal da dissertação é a validação do método cromatográfico seguido no laboratório de qualidade da UI-Equipar para a quantificação de TCA. A validação do método prende-se com o facto de ser necessária uma maior confiança nos valores obtidos nas análises cromatográficas, uma vez que a exatidão destes valores é imperial ao negócio, sendo que são estes que ditam o destino da matéria-prima ou produto em questão, consoante os critérios de rejeição definidos.

## 1.2. O Sobreiro e a Cortiça

O sobreiro (*Quercus suber* L.) é uma espécie que pertence ao género *Quercus*, da Família Fagaceae. Trata-se de uma espécie do sul da Europa e do norte de África, que ocorre de forma espontânea ou cultivada em todo o país, sobretudo no Alentejo Litoral. É uma árvore de porte médio, com uma copa ampla e altura média de 15 a 20 metros, podendo atingir, em casos extremos, os 25 metros. A raiz principal é profunda, em busca de humidade nas camadas mais fundas, razão que lhe permite viver em regiões relativamente pouco chuvosas. É uma árvore de folha persistente com uma grande longevidade – entre cento e cinquenta e duzentos anos.

O sobreiro apresenta excelentes capacidades regenerativas do seu tecido de proteção – a cortiça – um tecido vegetal suberoso, com um desenvolvimento notável, que reveste o seu tronco, ramos e raízes, e que se mantém durante toda a sua vida (Gil, 1999).

A estrutura celular e a composição química da cortiça natural extraída do *Quercus suber* L. conferem-lhe propriedades mecânicas, físicas e químicas notáveis entre as quais destaca-se por ser um material leve (baixa densidade – 0,12 a 0,30 g/cm<sup>3</sup>) e elástico (módulo de Young – tração –  $E = 20 \text{ MN/m}^2$ ), praticamente impermeável a líquidos e gases (coeficiente de difusão da água a 20 °C,  $D_{20\text{ °C}} = 5 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ ). Serve como isolante térmico (baixa condutividade térmica –  $k = 0,045 \text{ W/mK}$ ) e elétrico, absorvedor acústico e elástico, sendo também inócuo e praticamente imputrescível, e apresenta uma capacidade de ser comprimido praticamente sem expansão lateral.

A cortiça possui ainda propriedades extremamente importantes tais como boa resistência ao fogo, boa inércia química, grande capacidade de absorção e dissipação de energia, características inócuas, elevado coeficiente de atrito, flutuabilidade, entre outras (Fortes, 1990).

Do ponto de vista microscópico é constituída por camadas de células de aspeto alveolar, cujas membranas celulares possuem um certo grau de impermeabilidade e estão

cheias de um gás, usualmente considerado semelhante ao ar e que ocupa cerca de 90% do seu volume (Gibson, et al., 1981) (Pereira, et al., 1987).

Da sua composição química, os compostos mais importantes são (Cork, 2010):

- Suberina – polímero cuja macromolécula contém glicerol, ácidos gordos de cadeia longa (C<sub>14</sub>-C<sub>30</sub>) e compostos aromáticos – responsável pelas propriedades elásticas da cortiça, que corresponde a quase metade da estrutura de polímeros da parede celular (45%), sendo o seu principal componente;
- Lenhina – polímero isotrópico de ligações cruzadas – responsável pela rigidez estrutural das células e a respetiva resistência à compressão, assim como tensão contínua, e entra na sua constituição com valor percentual semelhante ao que ocorre em espécies produtoras de madeira rija (27%);
- Polissacáridos – responsáveis pela textura da cortiça, 12%;
- Taninos – responsáveis pela cor e proteção/conservação, 6%;
- Ceróides – responsáveis pela impermeabilidade da cortiça, 5%;
- Água mineral, glicerina e outros componentes (5%).

Tabela 1.1 - Constituição química da cortiça segundo diferentes autores (Natividade, 1950) (Guillemonat, 1960) (Lissia, et al., 1984) (Lissia, et al., 1984).

(Natividade, 1950)		(Guillemonat, 1960)	
Composição	% da Cortiça	Composição	% da Cortiça
Suberina	58%	Suberina	45%
Celulose	22%	Lenhina	27%
Lenhina	12%	Celulose e outros polissacáridos	12%
Água	5%	Taninos	6%
Cerina	2%	Ceróides	5%
Outros	1%	Cinzas e outros	5%
(Lissia, et al., 1984)		(Pereira, 1998)	
Composição	% da Cortiça	Composição	% da Cortiça
Substâncias saponificáveis (suberina)	45%		<i>Virgem Amadia</i>
Lenhina e celulose	30%	Suberina	38,6% 39,4%
Substâncias de natureza tânica		Lenhina	21,7% 21,8%
solúveis em água	10%	Polissacáridos	18,2% 19,9%
Água, cinzas, etc.	10%	Extratáveis <sup>1</sup>	15,3% 14,2%
Substâncias de natureza cerosa		Cinzas	0,7% 1,2%
extratáveis por solventes	5%	Monossacáridos (% do Total)	
		Glucose	50,6% 45,4%
		Xilose	35,0% 32,3%
		Arabinose	7,0% 13,2%
		Galactose	3,6% 5,1%
		Manose	2,8% 3,2%
		Ramnose	1,7% 0,8%

<sup>1</sup> Inclui componentes facilmente isoláveis da cortiça por simples extração com solventes. Estão incluídos os ceróides e os taninos, entre outros.

A extração da cortiça é habitualmente iniciada em maio e com uma periodicidade legal mínima de nove anos. O primeiro descortiçamento (desbóia) produz cortiça *virgem* e é feito quando a árvore tem entre 20 e 30 anos. Esta cortiça apresenta uma estrutura bastante irregular, com anéis de crescimento não concêntricos, canais lenticulares desalinhados segundo a direção radial, e uma superfície externa fendilhada conferindo-lhe um aspeto rugoso (Fortes, et al., 1988). O interesse económico desta cortiça é reduzido pelo que é utilizada essencialmente para trituração e aglomerados não-rolha. A separação da cortiça do tecido que lhe está subjacente, o entrecasco, dá-se por rotura das células de felogene e das células de cortiça mais recentes. O entrecasco fica assim exposto aos fatores exteriores, dando-se consequentemente a morte da felogene. Na Figura 1.2 encontram-se distinguidas as três camadas acima mencionadas (cortiça, felogene e entrecasco).



Figura 1.2 - Camadas da cortiça.

Com a migração de substâncias de reserva e de taninos, que se encontram nas regiões mais exteriores, para as proximidades do floema ativo, 25 a 35 dias após a despela, na região mais interna do floema inativo, diferencia-se uma nova assentada geradora de cortiça, ou seja, uma nova felogene (Figura 1.3) (Machado, 1935).

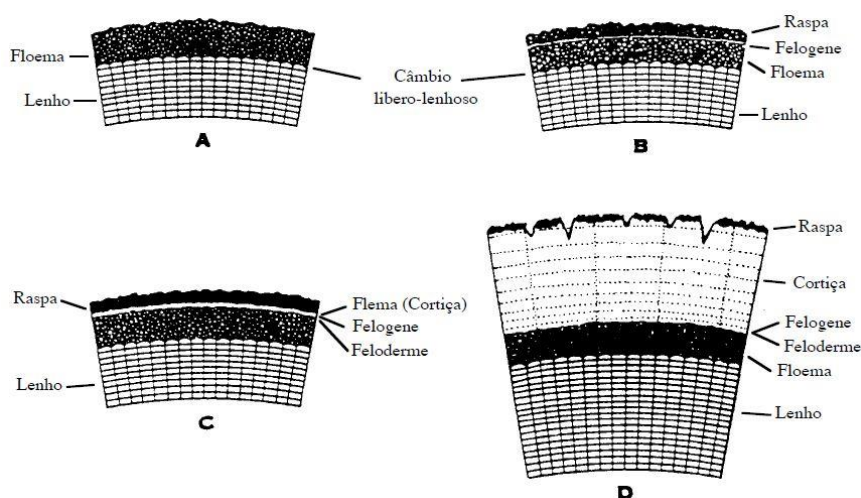


Figura 1.3 - Representação esquemática da formação da cortiça: A – Entrecasco após o descortiçamento; B – 30 dias depois; C – no fim do Outono; D – 9 anos depois (Natividade, 1950).

A cortiça produzida por esta nova felogene, regenerada mais internamente, designa-se por cortiça de reprodução, sendo a primeira chamada *secundeira*, e as restantes *amadias*.

Apesar da estrutura mais homogênea da cortiça secundeira, comparativamente à virgem, as suas camadas anuais de crescimento apresentam ainda uma disposição ondular conferindo-lhe uma estrutura irregular (Liese, et al., 1983). Desta forma, ela não vai ainda ao encontro das exigências dos produtos de maior qualidade como rolhas naturais, sendo aproveitadas principalmente para os aglomerados não-rolha.

Só a cortiça produzida a seguir à retirada da cortiça secundeira apresenta características de homogeneidade e crescimento regulares que lhe conferem as qualidades necessárias para a utilização em produtos qualitativamente mais exigentes.

### 1.2.1. Qualidade da Cortiça

A qualidade da cortiça pode-se traduzir nas suas propriedades mecânicas, físicas e químicas, e na sua homogeneidade, já mencionadas. É atribuída às condições do meio uma influência na qualidade da cortiça, no entanto, apesar desta influência, os principais fatores responsáveis pela sua qualidade dizem respeito, fundamentalmente, à natureza genética da árvore produtora (Silva, 2010).

Os defeitos que mais prejudicam as suas qualidades de homogeneidade do tecido, das propriedades físicas, químicas e mecânicas da cortiça são:

- A porosidade – as características de maior importância na apreciação da qualidade da cortiça é o número de lentículas por unidade de superfície, a sua forma e as suas dimensões;
- O prego – inclusões de tecidos subjacentes à felogene que surgem no parênquima suberoso;
- O verde – defeito da cortiça que se traduz por teores de humidade extremamente elevados;
- O marmoreado – machas azuis causadas pela presença de fungos prejudiciais para a cortiça, que afetam as suas qualidades organolépticas;
- A esfoliação – separação, em regiões da prancha, de assentadas de células (Carvalho, 1989), em geral associada a anos secos;
- O enguiado – surge como sulcos pronunciados, orientados longitudinalmente na costa das pranchas, podendo causar descontinuidades nas primeiras camadas da cortiça que foram produzidas;
- Causados por animais ou pragas: Cortiça formigada (formigas), cortiça cobrilhada (larvas) e cortiça picada (aves).

### 1.2.2. Calibre da Cortiça

Designa-se por calibre ou espessura da cortiça a distância que separa as costas da barriga de uma prancha. O calibre é expresso em milímetros ou mais vulgarmente em linhas. A linha é uma unidade utilizada unicamente no setor corticeiro e corresponde a 2,256 mm. É medida com um instrumento chamado *pé de linhas*, que é uma escala graduada em linhas utilizada como padrão de comparação na medição da espessura da cortiça.

A cortiça pode ser dividida em sete calibres, apresentados na Tabela 1.2:

*Tabela 1.2 - Calibres da cortiça segundo a norma portuguesa NP 298, 1993.*

Nome	Espessura (mm)	Espessura (linhas)
Delgadinha	14 – 22	6,2 – 9,8
Delgada	22 – 27	9,8 – 12,0
Meia Marca	27 – 32	12,0 – 14,2
Marca	32 – 40	14,2 – 17,7
Grossa	40 – 54	17,7 – 23,9
Triângulo	≥ 55	≥ 23,9

Onde o limite superior de cada uma das classes faz parte da mesma.

Do ponto de vista comercial, a cortiça mais valorizada é aquela que pode ser utilizada para a produção de rolhas naturais.

#### ***Legislação Aplicável***

A ação de descortiçamento, e demais ações conexas, tem como enquadramento legal o Decreto-Lei nº 169/2001 de 25 de Maio, alterado pelo Decreto-Lei nº 155/2004, de 30 de Junho, tendo implicações a nível operacional e administrativo.

Neste decreto estão descritos pontos como:

- i. A desbóia só é permitida em sobreiros cujo perímetro do tronco, medido sobre a cortiça, a 1,30 metros do solo, seja igual ou superior a 70 centímetros;
- ii. A altura do descortiçamento não pode exceder os seguintes múltiplos do perímetro do tronco, medido sobre a cortiça, a 1,30 metros do solo:
  - 2 vezes, para árvores produtoras de cortiça virgem
  - 2,5 vezes, para árvores produtoras de cortiça secundária
  - 3 vezes, para árvores produtoras de cortiça amadia

- iii. Não é permitida a extração de cortiça de amadia ou secundeira com menos de 9 anos de criação, exceto quando autorizado pelo ICNF para efeitos de accertos de meças ou folhas de extração;
- iv. No ato da extração é obrigatória a inscrição, com tinta indelével e de forma visível, do algarismo das unidades do ano de extração;

### 1.2.3. Contaminantes

A contaminação de vinho com aromas fúngicos é atualmente reconhecido como uma ameaça para o vinho. Tradicionalmente, e erroneamente, este fenómeno tem sido exclusivamente associado à rolha de cortiça. Deste ponto de vista, a rolha atuaria como fonte da contaminação de cloroanisol no vinho, especialmente o TCA. Este composto orgânico confere ao vinho, como já foi dito, um aroma fúngico desagradável.

Como consequência, este fenómeno tem sido chamado de *cork taint* – gosto a rolha – ou contaminação do vinho pela rolha. No entanto, tendo em conta as diferentes e múltiplas fontes de contaminação possíveis, o termo mais apropriado seria “contaminação do vinho por haloanisóis”. O uso indiscriminado do termo – gosto a rolha – contribui para propagar a ideia, entre o pessoal técnico de adegas, e também entre o público geral, que a contaminação do vinho por haloanisóis é atribuído, sempre e exclusivamente, à rolha.

Estes contaminantes podem também aparecer noutros alimentos, ou mesmo na água de consumo público. Na verdade, é um problema bem documentado e mais generalizado do que se poderia pensar, que não diz respeito apenas ao sector vitivinícola.

A contaminação do vinho por haloanisóis é mais complexa do que se presumia. Este problema é causado por vários fatores e compostos químicos, que não pode ser atribuído apenas à rolha de cortiça. Desta forma está-se a tornar cada vez mais evidente que uma elevada proporção das contaminações do vinho derivam de eventos de contaminação que ocorrem nas próprias adegas. Na Tabela 1.3 é possível observarem-se os resultados de um estudo realizado numa adega na Alemanha, onde foram obtidos os valores de 2,4,6-tricloroanisol (TCA), 2,4,6-triclorofenol (TCP), 2,4,6-tribromoanisol (TBA) e 2,4,6-tribromofenol (TBP) a partir de fontes como o ar, materiais da estrutura da adega e de vinho em barril, estudo realizado pela seção de microbiologia e bioquímica do centro de investigação Geisenheim (*Geisenheim Research Center Section of Microbiology and Biochemistry*) (Reynolds, 2010).

Tabela 1.3 – Teores haloanisóis em várias matrizes, segundo o estudo realizado pelo Geisenheim Research Center Section of Microbiology and Biochemistry (Coque, et al., 2006).

	Tipo de Amostra	Contaminantes			
		2,4,6-TCA (ng/l)	2,4,6-TCP (ng/l)	2,4,6-TBA (ng/l)	2,4,6-TBP (ng/l)
Material de Estrutura	Madeira do telhado da sala de enchimento	10,1	>200	3,1	102
	Teto de madeira da sala de enchimento	37,0	>5000	n.d.	n.q.
	Revestimento de madeira da parede	23	>1000	1,5	22
	Parede da sala de enchimento	50	>1000	n.q.	n.q.
Ar	Sala de prensagem	1,3	n.q.	n.q.	<10
	Sala de armazenamento	1,7	<10	n.q.	73
	Adega	6,8	55	n.q.	22
	Sala de enchimento	44,3	60	1	46
	Sala de enchimento após a remoção dos contaminantes	2,6	n.d.	n.q.	<10
Amostras de vinho	Amostra de Pinot Blanc de barril	n.q.	23	n.d.	n.q.
	Amostra de Silvaner de barril	n.d.	10	n.d.	21
	Amostra de vinho de mesa de barril	n.d.	<10	n.d.	n.q.
	Amostra de Pinot Blanc engarrafado	2,2	<10	n.d.	10
	Amostra de Pinot Blanc engarrafado	2,3	12	n.d.	17
	Amostra de vinho de mesa engarrafado	2,3	14	n.d.	16

O aroma fúngico do vinho é uma consequência de microrganismos (especialmente fungos filamentosos) no ambiente (água, ar, madeira, etc.), que ao entrarem em contato com halofenóis (a maioria provenientes de pesticidas), desenvolvem mecanismos de defesa que levam à produção de haloanisóis. Estes pesticidas são clorofenóis, fluorfenóis, iodofenóis e bromofenóis.

As suas características mais importantes são:

1. Produzem aromas desagradáveis frequentemente descritos como mofados ou bolorentos. No caso do 2,4,6-tribromoanisol (TBA), se a contaminação for

superior a 20 ng/l, além do aroma bolorento intenso, o vinho pode também exibir um carácter fenólico ou iodado (Chatonnet, 2004).

2. Os haloanisóis têm um limiar de deteção humana muito baixo em soluções alcoólicas. Este facto é muito significativo uma vez que apenas uma quantidade muito pequena de haloanisóis se consegue notar, com clareza, o cheiro e o sabor. O limiar de deteção tanto em água como no vinho estão listados na Tabela 1.3.
3. No geral, estes compostos são muito voláteis, sendo facilmente transmitidos através do ar, e apresentam uma grande capacidade de impregnar e contaminar madeira, cortiça e muitos outros materiais (polímeros plásticos, silicões, cartão e papel, etc.).

Em 1989 foram identificados vários compostos químicos responsáveis pela contaminação do vinho, denotando o papel do 2,4,6-TCA como agente contaminante principal.

No entanto, os cloroanisóis (2,4,6-TCA e 2,3,4,6-TeCA) foram previamente detetados, como contaminantes, noutros alimentos:

Em 1966 foram detetados ovos de galinha contaminados com TeCA.

Mais tarde foi reportado que o TeCA era o composto responsável pelo cheiro desagradável em carne de galinha (Curtis, et al., 1972) (Curtis, et al., 1974).

Mais recentemente, o TCA foi apontado como responsável pelo odor a mofo presente em águas de consumo público na Suécia (Nystrom, et al., 1992), e também como causa do mesmo odor detetado na bebida alcoólica tradicional japonesa, *sake* (Miki, et al., 2005).

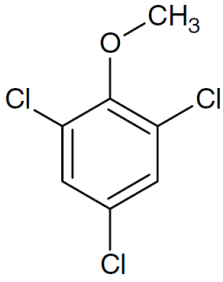
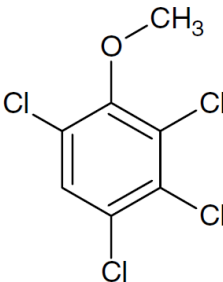
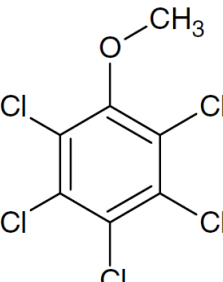
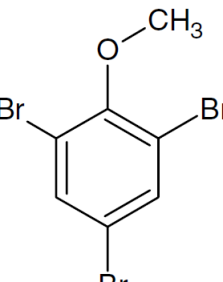
#### 1.2.3.1. Haloanisóis como contaminantes

Os haloanisóis (cloroanisóis e bromoanisóis) mais frequentemente identificados como contaminantes de vinho são o 2,4,6-tricloroanisol (TCA), o 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o 2,4,6-bromoanisol (TBA). A sua estrutura química pode ser vista na Tabela 1.4.

O anisol é um composto derivado do fenol, presente numa grande variedade de substâncias voláteis que são, geralmente, muito perfumadas. Quando um dos átomos dos halogéneos flúor, cloro, bromo ou iodo estão presentes na molécula do anisol, os compostos resultantes são chamados de haloanisóis, que podem ser fluoranisóis, cloroanisóis, bromoanisóis ou iodoanisóis, dependendo do halogénio presente na molécula.



Tabela 1.4 - Limite de Detecção Humana (L.D.H.), de vários compostos contaminantes, em diferentes matrizes.

Haloanisóis				
Composto	L.D.H.	Unid.	Meio	Referência
2,4,6-TCA	30 – 300	pg/l	Água	(Curtis, et al., 1972)
	4	ng/l	Vinho Branco Seco	(Griffiths, 1974)
	2	ng/l	Vinho Branco Seco	(Ribéreau-Gayon, et al., 2006)
	1,4 – 4,6	ng/l	Vinho	(Hervé, et al., 2000)
	17,4 <sup>1</sup> /210 <sup>2</sup>	ng/l	Sauvignon Blanc	(Sefton, et al., 2005)
	10	ng/l	Vinho Branco	(Suprenant, et al., 1997)
	60 – 100	ng/l	Vinho Tinto	(Pfeifer, 2002)
	22	ng/l	Vinho Tinto	(Álvarez-Rodríguez, 2003)
2,3,4,6-TeCA	4	ng/l	Água	(Curtis, et al., 1972)
	10 – 15	ng/l	Vinho Verde e Tinto	(Chatonnet, 2004)
	5	ng/l	Vinhos Espumosos	
PCA	> 50	µl/g	Vinho	(Chatonnet, 2004)
	4000	ng/l	Vinho	(Ribéreau-Gayon, et al., 2006)
2,4,6-TBA	8 – 30	pg/l	Água	(Saxby, et al., 1992)
	3,4 – 7,9	ng/l	Vinho	(Whitfield, et al., 1997)
				(Chatonnet, 2004)

<sup>1</sup> Painei de analistas experientes

<sup>2</sup> Painei de analistas inexperientes

Do ponto de vista biológico os haloanisóis são formados através de um mecanismo de defesa bioquímico chamado de biometilação, que ocorre em certos microrganismos (fungos como *Penicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Paecilomyces* ou *Verticillium* (Gomez-Ariza, et al., 2006)). Quando os fungos entram em contato com halofenóis, o fungo produz uma enzima oxidativa que é ativamente segregada pela célula para atacar e degradar os clorofenóis fora da célula. Desta forma, a maior parte do 2,4,6-TCP é degradado sem prejudicar o fungo. No entanto, uma vez que os clorofenóis são lipossolúveis, existe sempre uma pequena porção que consegue atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática chegando ao citoplasma e núcleo, onde consegue danificar proteínas, ou mesmo material genético. De modo a evitar esta ameaça, o sistema de defesa do fungo produz a enzima CPOMT (Clorofenol O-Metiltransferase). Esta enzima é responsável pela transformação do tóxico 2,4,6-TCP num composto inofensivo, o 2,4,6-TCA. Este composto é então segregado pela célula e é rapidamente absorvido pela cortiça, madeira, ou outro qualquer material onde o fungo esteja a crescer (Coque, et al., 2006).

Desta forma, a formação de haloanisóis é um mecanismo de sobrevivência para muitos microrganismos, quando expostos a ambientes poluídos com halofenóis.

Na Figura 1.4 é possível ver a biossíntese de TCA, incluindo o passo de metilação do clorofenol.

### 1.2.3.2. Origem dos halofenóis e haloanisóis

Os clorofenóis não são compostos naturais, apenas as suas origens antropogénicas são encontradas na natureza. Este facto determina que dificilmente sejam encontrados microrganismos capazes de degradar estes compostos químicos. Como consequência, estes compostos são bastante recalcitrantes e conseguem persistir em ecossistemas durante muito tempo (mesmo décadas).

(Nystrom *et al.*, 1992) propôs que os clorofenóis se poderiam formar durante o tratamento de cloração da água potável, devido à reação de hipocloração com fenóis dissolvidos na água. De uma maneira similar, na cortiça estes contaminantes poder-se-iam formar durante a hipocloração-lixiviação das rolhas (Sponholz e Muno, 1994). É importante mencionar que estas práticas de lixiviação já não são utilizadas pelas empresas de cortiça, tendo sido substituída pela lixiviação num banho peróxido de hidrogénio contendo soda cáustica.

A principal razão para a presença de clorofenóis em adegas e em pranchas de cortiça é o uso de PCP e 2,4,6-TCP como pesticidas em todo o mundo.

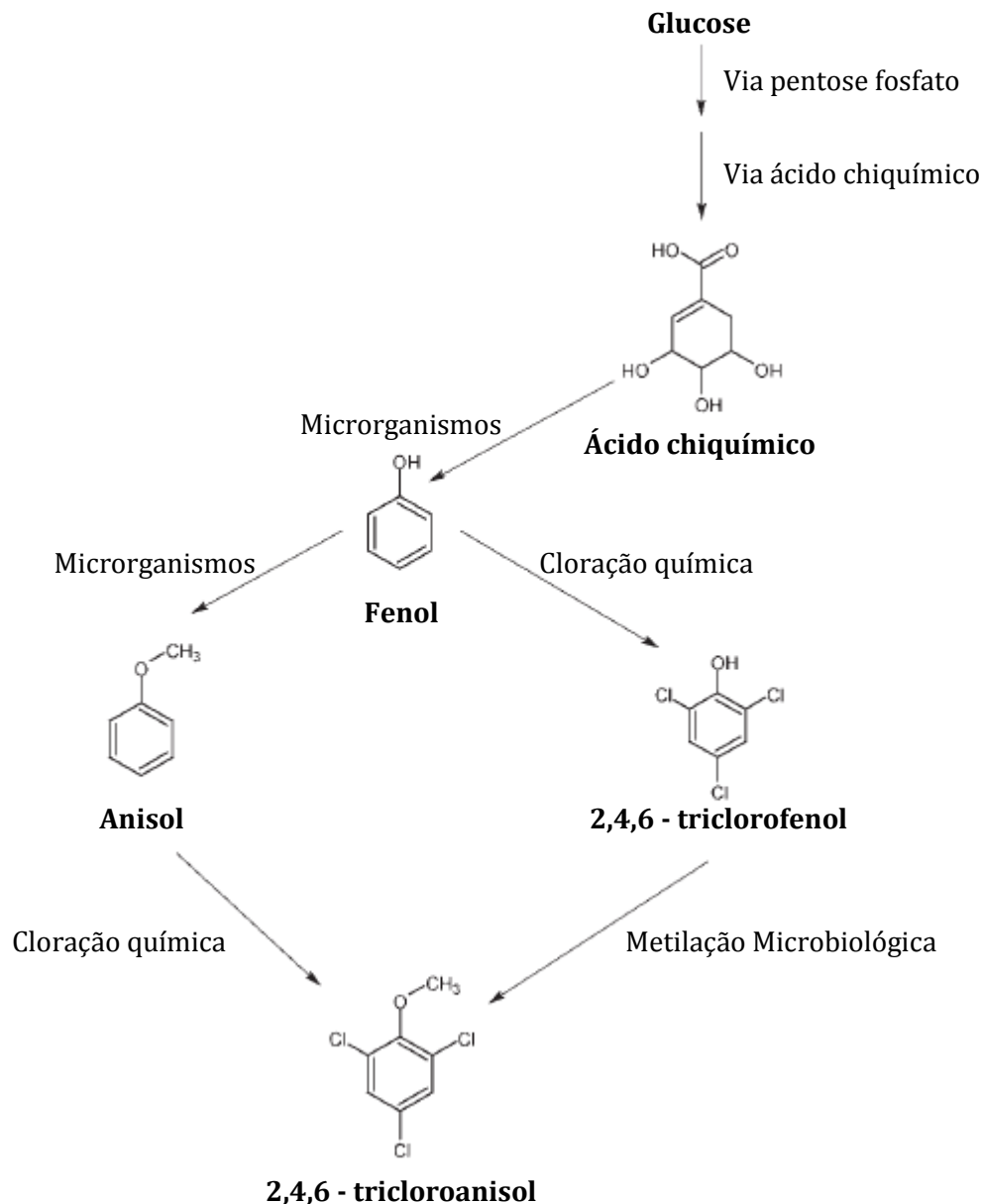


Figura 1.4 - Biossíntese de 2,4,6-tricloroanisol (TCA).

Existem várias razões para os clorofenóis terem sido tão utilizados em pesticidas:

- São bastante fáceis de sintetizar pela indústria química;
- São bastante baratos;
- São lipossolúveis e por essa razão conseguem atravessar facilmente membranas biológicas, entrando nas células;
- São bastante tóxicos. Esta toxicidade deve-se à sua capacidade de reagir e destruir proteínas e material genético das células;
- São bastante eficientes e têm um espectro de ação muito largo – não só são tóxicos para microrganismos como para insetos e plantas.

Os clorofenóis têm sido largamente utilizados, durante décadas, principalmente como fungicidas para preservar a madeira de ataques fúngicos, e também para prevenir o seu crescimento em materiais de embalagem como cartão, couro e produtos têxteis, colheitas de cereais e grãos armazenados em silos. Como consequência tornaram-se num dos mais importantes grupos de poluentes detetados em vários diferentes ambientes.

Correntemente, o uso de clorofenóis foi proibido na Europa, em 1991, devido às suas suspeitas características cancerígenas, sendo no entanto amplamente utilizados na Ásia, África e América do Sul.

Podemos então afirmar que a contaminação do vinho pode originar a dois níveis diferentes:

- Contaminação das pranchas de cortiça que ocorre diretamente no montado, ou nas instalações da empresa durante a armazenagem das mesmas, onde as condições de temperatura e humidade podem favorecer a formação de fungos que, na presença dos percussores, podem formar haloanisóis.
- Contaminação do vinho, ou da rolha, durante o seu armazenamento na adega. Neste caso a contaminação provém, geralmente, das estruturas de madeira (paredes, chão, tetos), barris ou estantes para o armazenamento das garrafas.

### 1.2.3.3. Principais desenvolvimentos pela indústria no combate ao TCA

#### ***Métodos de extração/neutralização ou prevenção da formação de TCA***

##### *I. Novos sistemas de cozedura*

São sistemas que permitem a cozedura uniforme de todas as pranchas a altas temperaturas. Estes sistemas permitem melhor extração dos compostos solúveis e também a extração de compostos orgânicos e voláteis como o TCA evitando, em simultâneo, a possibilidade de contaminação cruzada.

##### *II. Destilação sob vapor controlado*

A destilação de vapor de produtos de cortiça, particularmente de granulado utilizado em rolhas de champanhe e técnicas, é um processo altamente eficaz para a extração de TCA.

A volatilidade do TCA permite o seu arrastamento numa corrente de vapor.

Exemplo: Tecnologia ROSA® desenvolvida pela Amorim & Irmãos, S.A., De acordo com vários estudos (Hall, et al., 2004) (Sefton, et al., 2005) este processo remove 75-80% da contaminação.

### III. *Volatilização por arrastamento em temperatura e humidade controladas*

Este processo aproveita o facto de o TCA ter uma temperatura de volatilização de 60 °C. Num ambiente permanentemente renovado de humidade relativa elevada e temperatura acima dos 60 °C, é conseguida uma significativa extração de TCA das rolhas de cortiça. Este processo é utilizado em rolhas naturais dado que, para além da elevada eficácia na redução do TCA, não provoca deformação nas rolhas.

### IV. *Volatilização por arrastamento em fase gasosa de polaridade ajustada, sob temperatura e humidade controladas*

Baseando-se em princípios de extração de vapor, e procurando uma polaridade ajustada à extração de moléculas como o TCA, este processo introduz o uso de etanol na fase de arraste.

O processo permite o tratamento eficaz de rolhas de cortiça natural, preservando todas as suas propriedades físico-mecânicas pela combinação otimizada de temperaturas – próximas de 60 °C – contração de etanol na fase de vapor e introdução contínua de ar quente.

O processo simula a cedência de moléculas da cortiça para o vinho em garrafa, feito pelo dissolvente etanol. Desta forma promove-se precocemente a migração de aromas indesejados que são arrastados por uma corrente de extração contínua durante o ciclo de tratamento.

A tecnologia desenvolvida inspira-se no conceito de TCA migrável que, tendo surgido em meados da década de 90, abriu também portas a novas práticas de controlo de qualidade aplicáveis a rolhas.

### V. *Extração com CO<sub>2</sub> no estado supercrítico*

Este processo submete o granulado de cortiça a uma corrente de CO<sub>2</sub> em estado supercrítico para arrastar o TCA e, eventualmente, outros compostos voláteis, de produtos de cortiça.

Exemplo: Processo Diamant, desenvolvido pelo grupo OENEO.

### VI. *Symbios*

É o processo desenvolvido pelo Centro Tecnológico da Cortiça (CTCOR) que impede a formação de cloroanisóis em cortiça, dos quais se destaca o TCA. É um processo biológico que promove o desenvolvimento de microrganismos “benignos”, de ocorrência natural na cortiça, em detrimento de espécies microbiológicas com potencial de formação de

metabolitos indesejados e promove a inibição da biossíntese de cloroanisóis durante as etapas de transformação de cortiça.

#### VII. *Ações enzimáticas.*

Triclorofenol é o principal precursor de TCA por metoxilação fúngica do seu grupo OH. Algumas enzimas são capazes de polimerizar os compostos fenólicos, nomeadamente os clorofenóis, tornando-os indisponíveis para a metoxilação acima referida.

Entre outros processos como:

- Processo com patente europeia WO 01/41989 A2, desenvolvido em 2001 que se baseia numa suspensão de carvão ativado obtido a partir da casca de coco para lavar as rolhas.
- Processo desenvolvido pela empresa IonMed com tecnologia baseada no uso de radiação para esterilizar a rolha, removendo microrganismos que produzam TCA, sendo um processo de prevenção pois não elimina cloroanisóis já presentes na cortiça antes do tratamento.
- Processo desenvolvido pelo Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI) baseado no uso de radiação gama para destruir parcial ou totalmente o TCA, dependendo da dose utilizada.

Existem vários métodos de deteção de TCA na cortiça, normalmente métodos de análise química de extração associados à cromatografia.

1. *Cromatografia em fase gasosa (SPME-GC/MS, SPME-GC/ECD, etc.);*

2. *Análise sensorial.*

(APCOR, 2013) (Couto, 2013)

O método utilizado no laboratório de qualidade da UI Equipar para quantificar o teor de TCA é a cromatografia gasosa em coluna capilar e detetor ECD (*Electron Capture Detector*), com microextração em fase sólida HS-SPME (*Headspace Solid-phase Microextraction*).

## **1.3. Cromatografia**

As técnicas cromatográficas têm provavelmente as mais vastas e versáteis aplicações em química analítica. Estas incluem um número distinto de diferentes técnicas de separação. Numa mais ampla terminologia, cromatografia é uma técnica de separação de

uma amostra em várias frações e posterior medição ou identificação das mesmas, que nos providencia informações a nível qualitativo e quantitativo.

A separação da amostra nos seus compostos individuais pode ser descrita de uma maneira simples. A amostra contendo uma mistura de compostos entra no topo da coluna (Figura 1.5-a). As moléculas de cada composto começam, coletivamente, a mover-se ao longo da coluna a diferentes velocidades (Figura 1.5-b). As moléculas mais rápidas chegam ao fim da coluna primeiro, entram no detetor, correspondendo ao primeiro pico no cromatograma (Figura 1.5-c). As segundas moléculas mais rápidas são eluídas de seguida e o processo continua até que todos os compostos tenham sido eluídos (Figura 1.5-d).

Obtém-se uma separação quando um componente é suficientemente atrasado a ponto de prevenir uma sobreposição do seu pico com o do componente anterior. Quaisquer compostos que atravessem a coluna à mesma velocidade não são separados e terão o mesmo tempo de retenção.

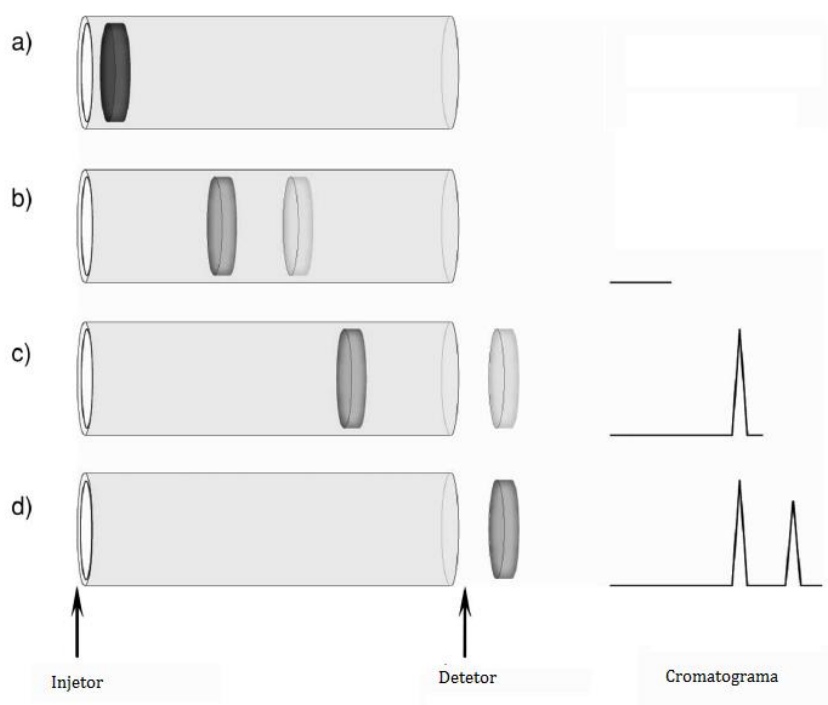


Figura 1.5 - Esquema de separação de compostos de uma amostra, numa coluna cromatográfica (Rood, 2007).

Os componentes, idealmente, emergem do sistema como uma curva de distribuição gaussiana e por ordem crescente de interação com a fase estacionária presente na coluna capilar.

As colunas capilares são compostas por três partes distintas. O tubo é feito de sílica fundida com um revestimento exterior de proteção e a fase estacionária, um líquido ou um sólido, que está depositado sob a forma de um filme fino no interior da coluna, sobre um material poroso inerte. A amostra, regularmente em fase gasosa ou dissolvida num solvente,

é arrastada através ou ao longo da fase estacionária. O componente de arraste pode ser um gás ou um líquido – a fase móvel.

No período em que a fase móvel é arrastada através da fase estacionária, os compostos da amostra sofrem uma série de interações, entre as duas fases (Figura 1.6). O que é explorado neste período são as diferenças nas propriedades químicas e físicas dos componentes da amostra, que geram diferentes velocidades de arraste entre os componentes – chamada migração. Moléculas presentes na fase móvel são arrastadas enquanto as moléculas presentes na fase estacionária não o são (Figura 1.6-b)). Eventualmente, cada molécula entra na fase estacionária, ao entrar em contato com a mesma, e toma o lugar de outra molécula que a está a abandonar esta fase (Figura 1.6-c)). A velocidade do movimento das moléculas ao longo da coluna depende da distribuição destas entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior a percentagem de moléculas na fase móvel, mais rápido se movem as moléculas ao longo da coluna, o que resulta num tempo de residência curto e consequentemente num pico com pouco tempo de retenção.

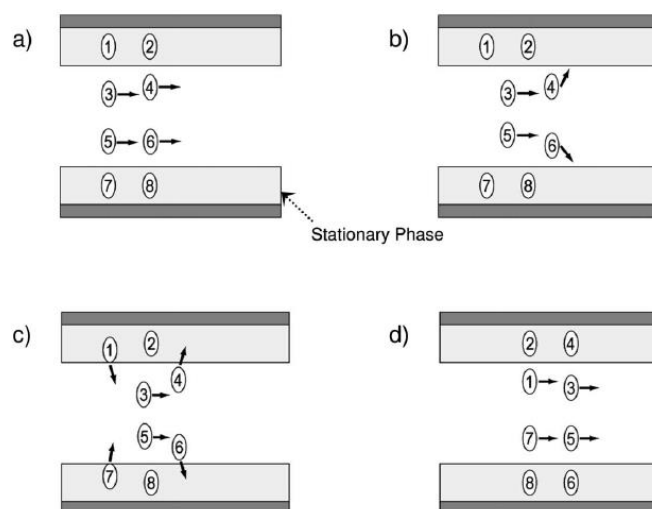


Figura 1.6 - Esquema das interações dos compostos com o revestimento da coluna cromatográfica (Rood, 2007).

A distância ou tempo entre os vários grupos de moléculas (cada grupo representando um composto) enquanto saem da coluna determina a separação entre os picos.

O comprimento da coluna ocupada por cada composto é bastante importante. Se uma banda de um composto for estreita, não é necessária uma grande separação entre duas bandas de dois compostos diferentes para prevenir a sobreposição dos seus picos (Figura 1.7-a)). No entanto, se a banda for larga, a mesma separação resultará na sobreposição dos dois picos (Figura 1.7-b)). Para que bandas de compostos largas não se sobreponham, é necessária uma maior separação (Figura 1.7-c)) (Rood, 2007).



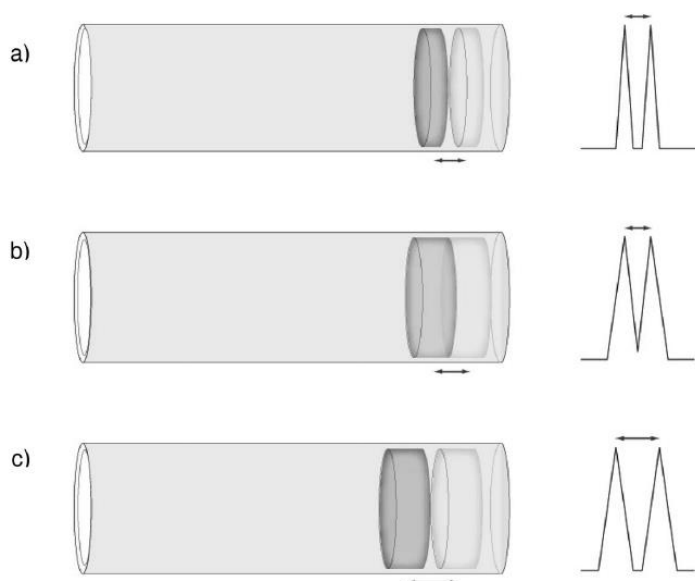


Figura 1.7 - Representação da diluição de compostos com diferentes tempos de retenção (Rood, 2007).

### 1.3.1. Classificação de Métodos Cromatográficos

A fase móvel pode ser um gás ou um líquido, enquanto a fase estacionária só pode ser um líquido ou um sólido. Quando a fase estacionária está contida na coluna, aplica-se o termo cromatografia em coluna. A fase estacionária pode também ocupar uma superfície plana, como um filtro de papel, à qual é chamada cromatografia planar.

Cromatografia em coluna pode ser subdividida em cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) que reflete o estado físico da fase móvel. A cromatografia gasosa compreende ainda a cromatografia gás-líquido (GLC) e cromatografia gás-sólido (GSC), nomes que denotam a natureza da fase estacionária.

A cromatografia líquida em coluna inclui vários distintos tipos de interação entre a fase móvel líquida e as várias fases estacionárias. Quando a separação envolve, predominantemente, uma simples partição entre dois líquidos imiscíveis, um estacionário e outro móvel, o processo denomina-se cromatografia líquido-líquido (LLC). Na cromatografia líquido-sólido (ou adsorção) (LSC) as forças de superfície estão principalmente envolvidas na capacidade retentora da fase estacionária. Iões ou compostos carregados são separados por cromatografia iônica (IC) por troca seletiva com contra iões da fase estacionária.

Em colunas com suportes de polímeros porosos, os componentes podem ser separados por cromatografia de exclusão (EC), onde a separação é largamente baseada no tamanho e geometria das moléculas (McGraw, et al., 2004).

### 1.3.2. Componentes da Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é composta por seis componentes principais: a fonte de gás e seus controladores de fluxo, o injetor, o detetor, o forno, a coluna, e o sistema de dados (Figura 1.8). Na maioria dos casos, o injetor, detetor e forno são partes integrais do cromatógrafo gasoso. A coluna, os gases e o sistema de gravação são componentes separados e geralmente fornecidos por outro produtor.

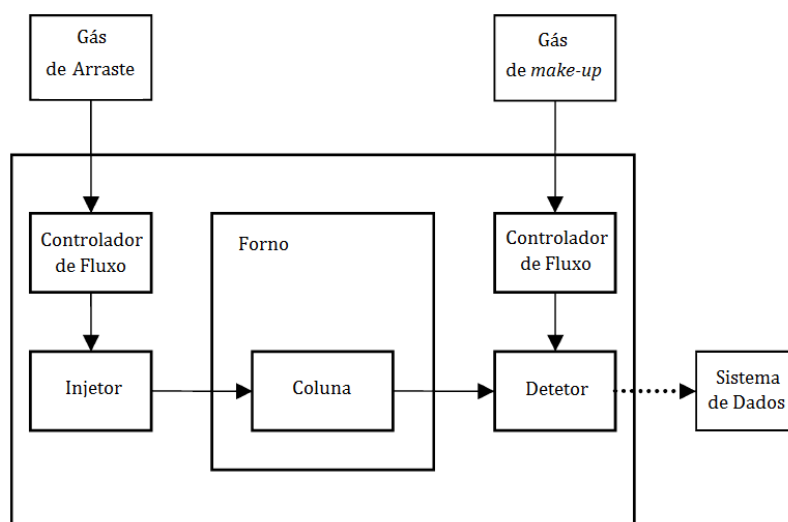


Figura 1.8 - Representação esquemática dos componentes principais da cromatografia gasosa.

#### 1.3.2.1. Gás e controladores de fluxo

Gases com elevado grau de pureza são fornecidos por cilindros pressurizados ou por geradores de gás. Reguladores de pressão no cilindro ou gerador controlam a quantidade de gás alimentado ao cromatógrafo. Controladores de fluxo ou reguladores de pressão no cromatógrafo gasoso controlam o fluxo dos vários gases, assim que entram no equipamento.

A coluna encontra-se instalada entre o injetor e o detetor. O gás, a um fluxo controlado, é alimentado ao injetor – este gás é chamado de gás de arraste. O fluxo de gás de arraste flui através do injetor até à coluna. O gás passa por todo o comprimento da coluna e sai através do detetor. Para funcionar como desejado, a maioria dos detetores requerem gases específicos.

#### 1.3.2.2. Injetor

O injetor é um cilindro metálico, oco, que contém o *liner*, que introduz a amostra no interior da coluna tubular. A coluna é inserida na base do injetor de maneira a que o topo da coluna fique na região mais baixa do *liner*.

O injetor é aquecido para que os compostos voláteis se tornem vapor e, então, serem arrastados pelo gás de arraste até à coluna.

Injetores “em coluna” depositam diretamente a amostra na coluna, sem o passo de vaporização, e são utilizados apenas em determinados tipos de amostras.

Em alguns casos são utilizados equipamentos especializados que introduzem a amostra diretamente na coluna, onde não é necessária seringa (e.g. *headspace*).

### 1.3.2.3. Coluna capilar e forno

A coluna encontra-se num forno cuja temperatura é controlada. Os compostos movem-se ao longo da coluna, que tal como já foi referido, tem no seu interior um revestimento de um material polimérico poroso, chamado fase estacionária. Esta fase impede o movimento de cada composto ao longo da coluna, em quantidades diferentes. Este comportamento chama-se retenção.

O comprimento e diâmetro da coluna, a estrutura química e quantidade de fase estacionária, e a temperatura da coluna afetam a retenção de cada composto. Se todos estes fatores forem devidamente selecionados, cada componente será eluído com tempos diferentes. Cada composto, ao deixar a coluna, é detetado e medido por um detetor.

### 1.3.2.4. Detetor

Cada composto ao sair da coluna entra no detetor. O detetor interage com os compostos baseado nalguma propriedade física ou química. Alguns detetores respondem a todos os compostos enquanto outros apenas respondem a um grupo seletivo de compostos. As interações geram sinais elétricos cuja intensidade corresponde à quantidade de composto presente na amostra. O sinal do detetor é enviado para um sistema de gravação para posterior desenho do gráfico.

### 1.3.2.5. Sistema de dados

O aparelho de gravação desenha o gráfico de acordo com a intensidade do sinal do detetor *versus* o tempo decorrido. O gráfico é chamado de cromatograma e neste aparece uma série de picos, como demonstrado na figura (Figura 1.9).

## 1.3.3. Detetor por Captura Eletrónica (ECD)

A cromatografia gasosa, ao permitir acoplar diferentes detetores, possibilita a análise de misturas complexas, com rapidez, elevada resolução e sensibilidade.

Os cromatógrafos presentes no laboratório de qualidade da UI-Equipar possuem detetores por captura eletrónica (ECD). O ECD é um detetor bastante seletivo e de grande sensibilidade para compostos que “capturem eletrões”. É um detetor de ionização, mas ao contrário da maioria dos detetores desta classe, as amostras são detetadas ao causar uma diminuição no nível de ionização.

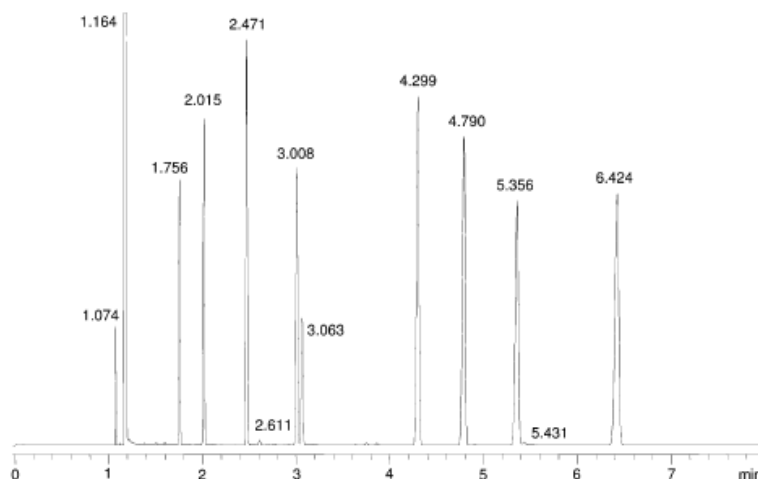


Figura 1.9 - Representação de um cromatograma (Rood, 2007).

Quando não está presente nenhum analito, o  $^{63}\text{Ni}$  radioativo emite partículas beta como demonstrado na Equação 1.



Estas partículas carregadas negativamente colidem com o gás azoto e produzem mais eletrões:



Os eletrões formados pela combinação destes dois processos originam uma corrente de alto nível quando estes são recuperados por um elétrodo positivo. Quando um analito eletronegativo é eluído da coluna e entra no detetor, captura alguns dos eletrões livres e a corrente baixa, originando um pico negativo:



A resposta do detetor surge num cromatograma em forma de picos ou bandas cujas intensidades são proporcionais à absorção ou captura do analito, que por sua vez é

proporcional à concentração do mesmo e à sensibilidade do detetor. A junção desses detetores com a cromatografia gasosa confere ao sistema uma elevada sensibilidade e precisão na análise de substâncias voláteis com concentrações vestigiais

O gás de arraste utilizado no ECD pode ser azoto puro, como indicado atrás, ou uma mistura de árgon-metano (95/5). O árgon puro e o hélio não são aconselháveis porque formam rapidamente iões metastáveis que podem transferir a sua energia de excitação por colisão com vapores de soluto, resultando daí efeitos de ionização indesejáveis.

A resposta do detetor surge num cromatograma em forma de picos ou bandas cujas intensidades dependem da concentração da substância e da sensibilidade do detetor. A junção desses detetores com a cromatografia gasosa confere ao sistema uma elevada sensibilidade e precisão na análise de substâncias voláteis com concentrações vestigiais (McGraw, et al., 2004) (McNair, et al.).

## **1.4. Microextração em Fase Sólida (SPME)**

Já vários procedimentos foram propostos para a deteção e quantificação do TCA, técnicas de extração líquido-líquido como por exemplo (Buser, et al., 1982) e (Boutou, et al., 2003), extração em fase sólida (Cadahia, et al., 2000), microextração em fase sólida (Riu, et al., 2006), extração sorptiva em barra de agitação (Zalacain, et al., 2004), espaço de cabeça dinâmico (Gomez-Ariza, et al., 2006) e extração por fluidos supercríticos (Taylor, et al., 2000).

O método de extração seguido na UI-Equipar é a microextração em fase sólida (SPME – *Solid-phase Microextraction*), método esse, descrito de forma mais pormenorizada de seguida.

A microextração em fase sólida, SPME, foi desenvolvida por Pawliszyn e pelos seus colaboradores em 1990 (Pawliszyn, et al., 1990). É uma técnica de extração e pré-concentração que surgiu como uma alternativa aos métodos tradicionais de extração em espaço de cabeça dinâmico, extração líquido-líquido e outras técnicas de extração. Esta técnica envolve a exposição de uma fase estacionária à amostra e a partição de analitos entre fases.

Esta técnica tem sido rotineiramente combinada com cromatografia gasosa e aplicada a uma grande variedade de compostos, e especialmente para extração de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis de ambientes biológicos e amostras alimentares. Possui várias vantagens tais como a sua simplicidade de utilização, rapidez, automatização de preparação das amostras, ausência de solventes orgânicos e caracterização do espaço de cabeça da amostra, fornecendo um extrato representativo dos

compostos presentes na amostra (Graham, et al., 1996), além de prolongar o tempo de vida da fibra, ao não entrar diretamente em contato com a amostra.

Em SPME, existe um conjunto de parâmetros que devem ser otimizados de modo a se conseguir uma extração o mais eficiente possível, nomeadamente a polaridade e espessura da fibra, o tempo de extração, a temperatura de extração, a adição de sal e o tempo de dessorção da fibra no injetor.

O tempo de extração afeta diretamente a quantidade de analito sorvido na fibra. A sorção deve ser inicialmente rápida, seguindo-se uma fase mais lenta à medida que a superfície da fibra começa a ficar saturada e o equilíbrio é atingido. Apesar de um tempo de extração mais elevado melhorar a recuperação, a partir de determinado tempo, o ganho adicional em sensibilidade não justifica o aumento do tempo de extração.

No que diz respeito à adição de sal à amostra, esta pode em alguns casos provocar o aumento da força iónica da matriz, reduzindo a solubilidade de alguns analitos, beneficiando como tal a partição do analito pela superfície da fibra. Por outro lado, tais medidas podem provocar um aumento na solubilidade de certos analitos.

A agitação beneficia a extração, reduzindo o seu tempo, sobretudo no caso de analitos com pesos moleculares e coeficientes de difusão mais elevados. No entanto, é necessária uma agitação consistente, sob o risco de se obterem resultados com baixa precisão.

A técnica de SPME pode funcionar num de dois sistemas:

1. Sistema de duas fases – quando se está na presença de uma amostra que ocupa o volume total do recipiente onde se encontra. As duas fases são a fase da amostra – gasosa ou líquida – e a fase estacionária, o revestimento do suporte sólido da fibra utilizado;
2. Sistema de três fases – quando se está na presença de uma amostra que não ocupa o volume total do recipiente onde se encontra. As três fases são a fase da amostra – sólida ou líquida – uma fase gasosa, correspondente ao espaço de cabeça da amostra, e a fase estacionária, o revestimento do suporte sólido da fibra utilizado.

No caso de sistemas de três fases, a análise pode ser feita de dois modos distintos: imergindo a fase estacionária na solução a analisar, *Direct Immersion*: DI-SPME (Figura 1.10-c)), ou colocando-a em contacto com o respetivo espaço de cabeça, *Headspace*: HS-SPME (Figura 1.10-d)). Assim, a quantidade de analito sorvida na fase estacionária pode ser relacionada com a concentração de equilíbrio dos analitos nas fases do sistema.

Analitos que exibem pressão de vapor podem ser extraídos através da imersão direta da fibra na amostra, bem como através da colocação da fibra no meio gasoso acima

da amostra. Pelo contrário, analitos que não exibem pressão de vapor devem obrigatoriamente ser extraídos por imersão da fibra.

A extração em *headspace* apresenta a vantagem de proteger o revestimento da fibra de moléculas com maior peso molecular e outras interferências não-voláteis presentes na matriz da amostra. O modo de *headspace* permite ainda modificações na matriz, tais como mudanças no valor do pH, sem danificar a fibra. Em relação à quantidade extraída, comparando o modo de *headspace* e imersão, esta é a mesma no equilíbrio, desde que os volumes de amostra e gás sejam os mesmos.

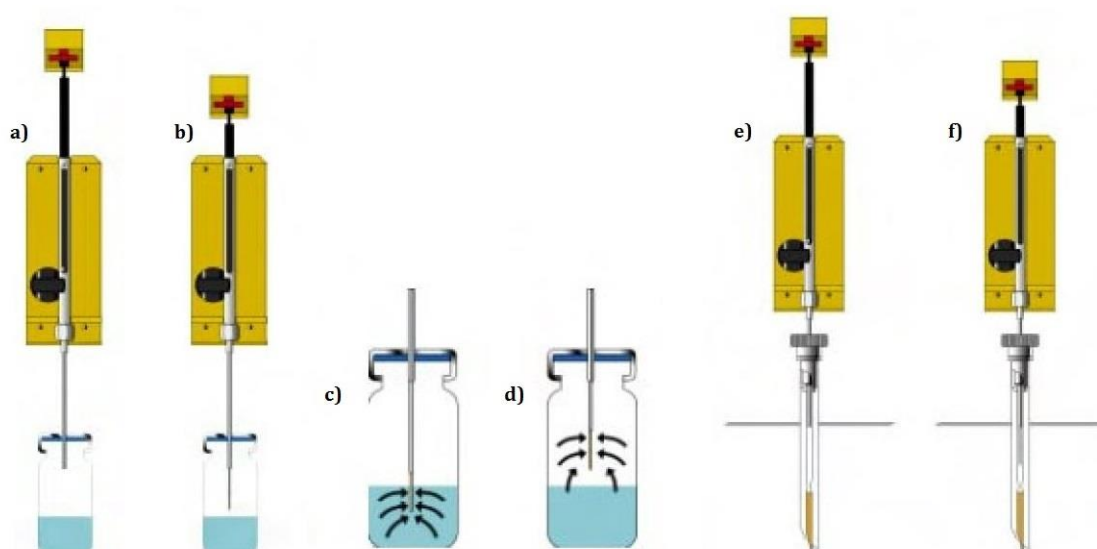


Figura 1.10 - Etapas de um ciclo de SPME. a) e b) Sorção: penetração da agulha e exposição à amostra. c) Extração direta. d) Extração em headspace. e) e f) dessorção da fibra no injetor do cromatógrafo gasoso.

Considerando um sistema de três fases no equilíbrio, a quantidade total de analito acumulada na fase estacionária é igual à quantidade de analito em equilíbrio nas três fases:

$$C_0 V_2 = C_1^\infty V_1 + C_2^\infty V_2 + C_3^\infty V_3 \quad \text{Eq. 4}$$

Onde,

$C_0$  – concentração inicial do analito na amostra;

$C_1^\infty, C_2^\infty, C_3^\infty$  - concentrações de equilíbrio na fase estacionária, amostra e espaço de cabeça, respetivamente;

$V_1, V_2, V_3$  – volume da fase estacionária, amostra e espaço de cabeça respetivamente.

Utilizando o conceito de coeficiente de partição entre fase estacionária e espaço de cabeça  $K_1 = \frac{C_1^\infty}{C_3^\infty}$  e entre o espaço de cabeça e amostra  $K_2 = \frac{C_3^\infty}{C_2^\infty}$ , a quantidade de analito

acumulada pela fase estacionária, denominada capacidade de revestimento,  $n = C_1^\infty V_1$ , pode ser expressa como:

$$n = \frac{K_1 K_2 V_1 V_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 K_3 V_3 + V_2} C_0 \quad \text{Eq. 5}$$

Assim, dependendo dos coeficientes de partição entre as fases e dos volumes de cada fase, pode ser traçada uma relação de proporcionalidade entre a concentração inicial do analito na amostra e a quantidade de equilíbrio do analito acumulada na fase estacionária.

Sendo a técnica de SPME baseada na sorção, a amostra sólida ou líquida é colocada num frasco selado com um septo, de seguida a amostra é termostatizada para que os compostos voláteis se libertem desta e passem para o espaço de cabeça. É então estabelecido um equilíbrio entre a fase que contém os componentes voláteis e a fase que contém a amostra (Rocha, et al., 2006).

#### 1.4.1. Fase Estacionária

Existem vários tipos de fases estacionárias em SPME (Tabela 1.5), pelo que a escolha do tipo de fibra, específica para os compostos com interesse analítico, é um dos aspetos críticos na otimização da SPME. A sua escolha está dependente quer da composição da fração volátil da amostra que se pretende analisar, quer das condições experimentais.

Um parâmetro bastante importante na escolha da fibra é a sua polaridade. Atendendo ao facto de que apenas cerca de 1 centímetro da fibra está exposto à matriz da amostra, o revestimento de uma fibra de SPME deve ser apolar, ou então fortemente polar.

A espessura da fibra influencia igualmente os resultados da extração, visto a difusão do analito desde a matriz da amostra até ao revestimento da fibra de SPME ser proporcional à espessura deste. Um filme mais espesso retém compostos voláteis e transfere-os até aos locais de injeção do cromatógrafo gasoso sem perdas. Pelo contrário, em compostos com pontos de ebulição mais elevados, um filme pouco espesso assegura uma mais rápida difusão e libertação do analito durante a dessorção térmica no cromatógrafo gasoso. Um filme espesso remove efetivamente da matriz compostos com ponto de ebulição elevados, no entanto, a velocidade de dessorção será menor, correndo-se o risco de transportar os analitos até à próxima extração.



Tabela 1.5 - Principais fases estacionárias utilizadas em cromatografia gasosa.

Fase estacionária	Espessura (µm)	Temperatura (°C)	Uso recomendado
	100	200 – 270	VOCs <sup>1</sup>
PDMS	30	200 – 270	VOCs apolares
	7	220 – 320	VOCs semi polares
PDMS/DVB	65	200 – 270	Voláteis polares
	60	200 – 270	HPLC
CX/PDMS	75	240 – 300	VOCs vestigiais
CW/DVB	65	200 – 260	Compostos polares
CW/TPR	50	230 – 270	Compostos polares
PA	85	220 – 310	VOCs polares

Em SPME, as fibras apresentam vantagens como o facto de poderem ser utilizadas inúmeras vezes, dependendo no entanto, do tipo de aplicação a que as mesmas são sujeitas, da composição da amostra, das condições experimentais e dos cuidados nos respetivos manuseamentos (Almeida, et al., 2004).

O dispositivo mais utilizado na técnica de SPME consiste num tubo metálico onde é colocada uma fibra que lhe confere um aspeto de seringa.

O suporte da fibra consiste num corpo cilíndrico de aço inoxidável, num êmbolo com uma mola e um guia de agulha ajustável (Figura 1.11). A fibra de sílica fundida é revestida com uma película relativamente fina de fase estacionária polimérica. Esta película concentra os analitos orgânicos, provenientes da matriz da amostra em estudo, à sua superfície durante o processo de sorção.

Além desta, têm também sido desenvolvidas outras configurações para a técnica de SPME (Lord, et al., 2000):

- Fase estacionária colocada nas paredes do recipiente;
- Num tubo por onde a amostra é passada;
- Na forma de partículas suspensas na solução;
- Como revestimento de um agitador;
- Sob a forma de disco ou membrana.

<sup>1</sup> VOC – Volatile Organic Compound

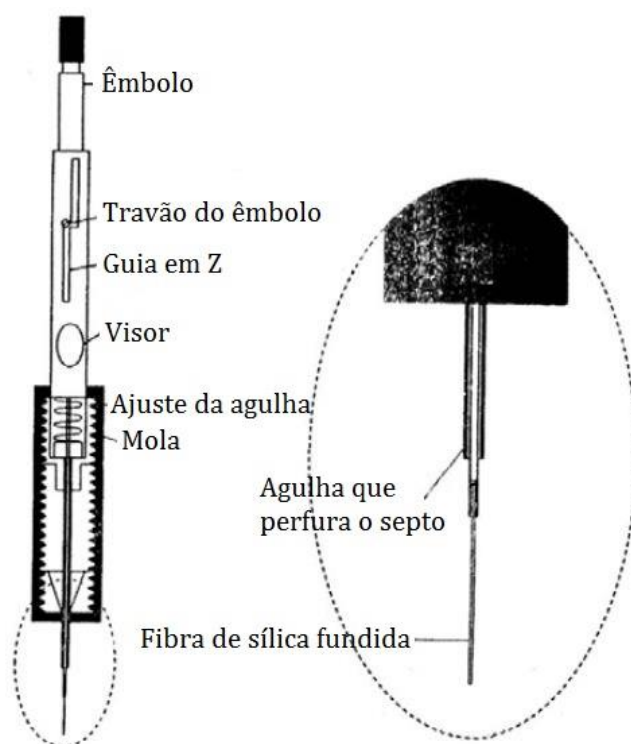


Figura 1.11 - Exemplo do sistema de uma agulha SPME (Rood, 2007).

## 1.5. Determinações Quantitativas

Os detetores cromatográficos que respondem à concentração produzem um sinal que é proporcional à concentração do soluto que passa através do detetor. Para estes detetores a área do pico é proporcional à massa do componente e inversamente proporcional ao fluxo da fase móvel. Então, o fluxo deve ser mantido constante se a quantificação for necessária.

Em detetores diferenciais que respondem ao fluxo de massa o pico não exibe nenhuma dependência com o fluxo da fase móvel.

### 1.5.1. Integração da Área do Pico

Altura do Pico – as medições são feitas desde a altura máxima do pico até à linha de base;

Produto da Altura do Pico e da Largura do Pico a Meia Altura – as medições são feitas assumindo a forma triangular de um pico que segue uma distribuição gaussiana.

### 1.5.2. Integração Computacional

Um integrador computacional determina automaticamente a área do pico desde o ponto em que o traço cromatográfico deixa a linha de base até ao momento em que regressa.

### 1.5.3. Métodos de Avaliação

Uma vez medida a altura ou área do pico, existem quatro principais métodos de avaliação que podem ser utilizados para traduzir estes valores em quantidades de soluto.

#### **1) Calibração por Standerização**

São preparadas curvas de calibração para cada componente a partir de soluções padrão puras, utilizando volumes de injeção e condições de operação idênticas para as amostras e padrões. A concentração do soluto é lida a partir da curva de calibração ou, se a curva for linear,

$$X = K(\text{área})_x \quad \text{Eq. 6}$$

onde  $X$  é a concentração de soluto e  $K$  é a constante de proporcionalidade (declive da curva de calibração). Neste método de avaliação a área do pico de interesse tem de ser medida.

#### **2) Normalização da Área**

Para que este método seja aplicável, a amostra inteira tem de ser eluída, todos os componentes têm de ser separados, e cada pico tem de estar completamente resolvido. É feita a soma de todas as áreas. A percentagem de componentes individuais é obtida ao se multiplicar cada área calculada individualmente por 100 e então dividida pelo soma total das áreas calculadas.

#### **3) Padrão Interno**

Nesta técnica uma quantidade conhecida de padrão interno é introduzida no cromatógrafo, e o rácio área:concentração é determinado. Então uma conhecida quantidade de padrão interno é adicionado à amostra antes de qualquer tratamento ou operação de separação. A área do pico do padrão na amostra é comparada com o pico da área quando o padrão é corrido separadamente. Este rácio serve como um fator de correção para a variação do tamanho da amostra, para perdas em qualquer operação de pré-tratamento preliminar, ou para eluições incompletas da amostra.

#### **4) Adição de Padrão**

Se apenas forem corridas algumas amostras, é possível empregar o método de adição de padrão. Realiza-se o cromatograma da amostra desconhecida. De seguida uma quantidade conhecida de analito é adicionada, e a cromatografia é repetida usando os mesmos reagentes e procedimentos. Pelo aumento da área do pico (ou altura), a concentração original pode ser calculada por interpolação. A resposta do detetor tem de ser uma função linear da concentração do analito e não pode dar resposta quando a concentração do analito é zero.

Se se é obtida uma leitura (área ou altura),  $R_x$ , a partir da amostra de concentração desconhecida  $x$ , e uma leitura  $R_1$  é obtida da amostra à qual foi adicionada uma concentração de analito conhecida  $a$ , então  $x$  pode ser calculado pela relação:

$$\frac{x}{x + a} = \frac{R_x}{R_1} \quad \text{Eq. 7}$$

Deve ser feita uma correção para a diluição caso a quantidade de padrão adicionada altere significativamente o volume da amostra (McGraw, et al., 2004).

## **1.6. Análise Sensorial**

Além da técnica cromatográfica, para a deteção de TCA, outra das técnicas implementadas para controlo de qualidade, para a deteção deste composto, é a análise sensorial. Esta técnica recorre ao olfato ou ao paladar para identificar a presença de compostos que causem desvios organoléticos.

Uma vez que esta técnica recorre ao olfato ou paladar, os limites de deteção e identificação dos compostos podem variar de analista para analista, tendo em conta a sua experiência, o método seguido, e ainda fatores como o *stress* e/ou fadiga. O valor mínimo ao qual existe estímulo sensorial, não sendo identificável, designa-se por limite de deteção olfativo. O valor mínimo do estímulo ao qual existe a perceção e identificação da sensação designa-se por limite de reconhecimento olfativo.

O Projeto Quercus, trabalho de investigação levado a cabo pelo setor corticeiro, com o apoio da Comunidade Europeia, teve como resultados o desenvolvimento de metodologias de análise e controlo que permitam a produção de rolhas isentas de desvios organoléticos, bem como os seus respetivos limiares de deteção olfativa (em água e vinho), presentes na Tabela 1.6 (Moutinho, 2008).

Tabela 1.6 - Desvios organoléticos de vários compostos contaminantes e respectivos limites de percepção e reconhecimento, em água e vinho branco (Coque, et al., 2006).

Composto	Descritor	Água		Vinho Branco	
		Limite de percepção	Limite de reconhecimento	Limite de percepção	Limite de reconhecimento
2,4,6-TCA	Mofo	0,8 ng/l	1,0 ng/l	1,5 ng/l	4,2 ng/l
Guaiacol	Farmacêutico, Fumo	–	–	15µg/l	200 µg/l
2-Metilisobomeol	Terroso, Batata	3,2 ng/l	8,0 ng/l	29 ng/l	51 ng/l
Geosmina	Terroso	0,17 ng/l	0,1 ng/l	– <sup>1</sup>	– <sub>5</sub>
2,4,6-TCP	Químico, Fenólico	–	–	43 µg/l	–

De forma a harmonizar o vocabulário de descritores a usar na análise sensorial de rolhas de cortiça, foi também elaborada uma Roda de Aromas (Figura 1.12).

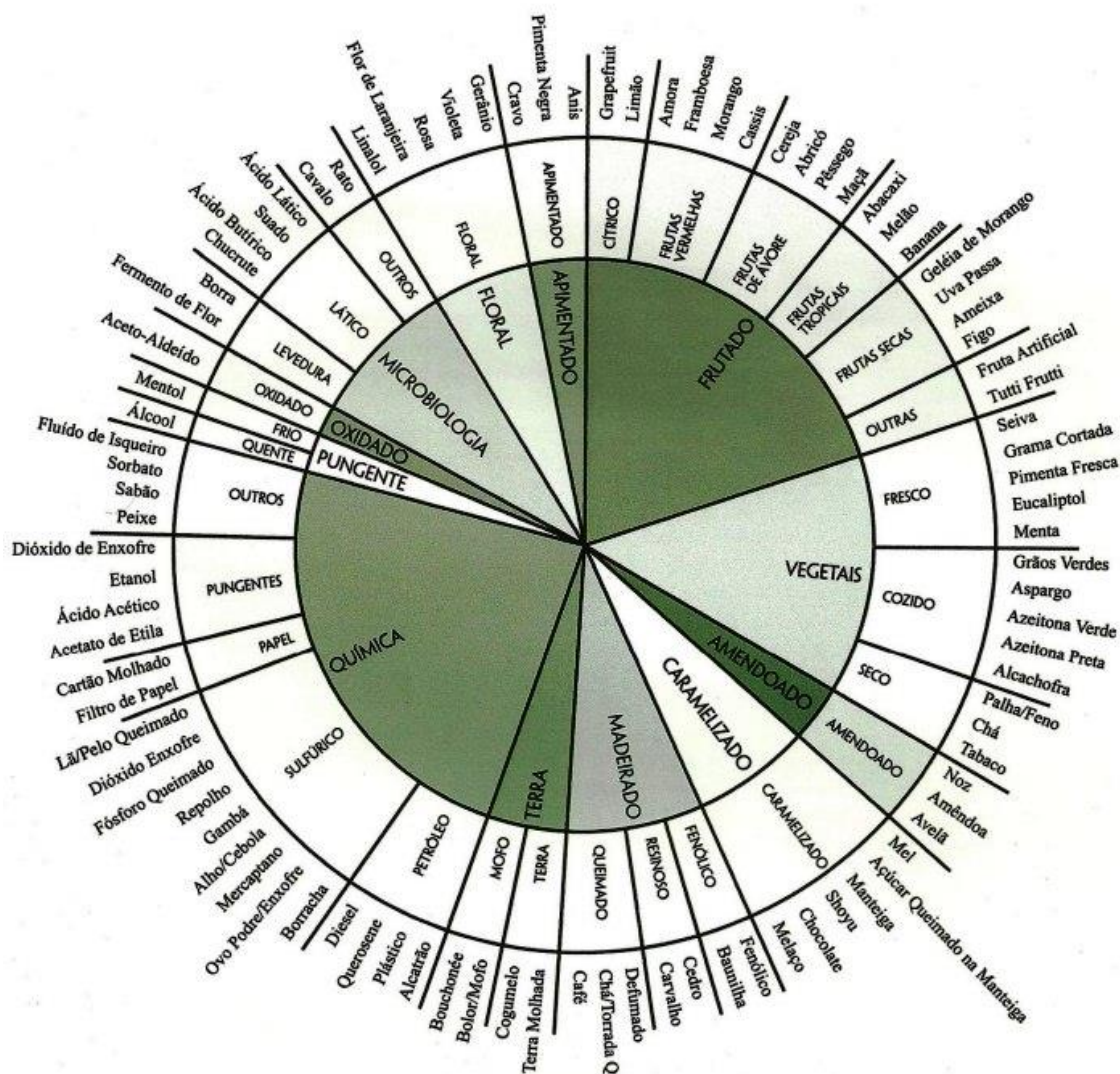


Figura 1.12 - Roda dos Aromas (Adaptado de Ann Noble <http://winearomawheel.com>).

<sup>1</sup> - Molécula instável em meio ácido, resultando na sua fragmentação e consequente abaixamento do respetivo teor em vinho.

As abordagens do método analítico atuais estabelecem uma metodologia de análise que combina dois tipos de testes sensoriais, a descrição qualitativa – *Qualitative Descriptive* – e a diferença em relação ao controlo – *Difference from Control*.

O procedimento do método analítico segue uma lista de regras gerais – para coordenador, provadores, sala de prova, copos de prova, simulador, envolvente – descritas nas normas ISO 22308 (*sensory analysis - cork stoppers*), ISO 5497 (*preparation of samples*), ISO 8589 (*design of test rooms*), ISO 6658 (*general guidance*), ISO 3972 (*sensitivity of taste*) e ISO 5496 e ISO 8586 (*selection, training and monitoring of assessors*).

## **1.7. Validação do Método Cromatográfico**

A validação de um método é o processo de demonstração de que os procedimentos analíticos seguidos, num determinado laboratório, são adequados ao uso a que se destinam. Este processo visa avaliar as características do método, controlar variáveis que afetam a obtenção do resultado e introduzir o conceito de incerteza global associada ao resultado.

A validação está completa quando se demonstrou que se cumpriram todos os critérios de aceitação, devidamente descritos num relatório.

Este processo implica a avaliação de diversos parâmetros, tendo sempre em conta a finalidade do método visado e os pré-requisitos estabelecidos.

Os requisitos mínimos para a validação de um método analítico dependem do guia e compreendem o estudo de diversos parâmetros (Tabela 1.7).

### **1.7.1. Especificidade**

É a capacidade de se identificar inequivocamente o analito na presença de outros componentes esperados tal como impurezas e produtos de degradação. A especificidade mede apenas o componente desejado sem a interferência de outras espécies que podem estar presentes, onde a separação não é necessariamente requerida.

O termo “seletividade” é por vezes utilizado para descrever a especificidade. São no entanto, tecnicamente, diferentes (Nogueira DQB/FCUL) (Bliesner, et al., 2006).

Tabela 1.7 - Parâmetros estudados para a validação de métodos, segundo diferentes guias (Nogueira DQB/FCUL).

Parâmetros de validação conforme diferentes guias					
Parâmetros Analíticos	USP <sup>1</sup>	ICH <sup>2</sup>	FDA <sup>3</sup>	EURACHEM <sup>4</sup>	USEPA <sup>5</sup>
<b>Especificidade</b>	×	×	×	×	
<b>Seletividade</b>				×	×
<b>Precisão:</b>					
Repetibilidade	×	×	×	×	×
Reprodutibilidade		×		×	×
Precisão Intermédia		×	×		
<b>Exatidão</b>	×	×	×	×	×
<b>Veracidade</b>				×	×
<b>Linearidade</b>	×	×	×	×	×
<b>Gama de Trabalho</b>	×	×	×	×	×
<b>Limite de Detecção (LOD)</b>	×	×	×	×	×
<b>Limite de Quantificação (LOQ)</b>	×	×	×	×	×
<b>Robustez</b>	×		×	×	×

### 1.7.2. Seletividade

É definida como a capacidade de um método separar o analito de restantes componentes que podem estar presentes na amostra, incluindo impurezas. Seletividade corresponde à separação e representação de todos os componentes da amostra. Portanto é possível que um método seja específico no entanto não ser seletivo (Nogueira DQB/FCUL) (Bliesner, et al., 2006).

A seletividade pode ser avaliada através de ensaios de recuperação, com critério de aceitação entre 80 e 120% (SANCO/10684, 2009) (Ribeiro, 2008).

$$R = \frac{\text{Concentração obtida} - \text{Concentração nativa}}{\text{Concentração adicionada}} \times 100 \quad \text{Eq. 8}$$

Sendo *Concentração nativa* a concentração já presente na amostra, e a *Concentração adicionada* a quantidade de analito que é fortificado à amostra.

Na Figura 1.13 está representado um exemplo de um teste de recuperação de TCA.

<sup>1</sup> USP – United States Pharmacopeia;

<sup>2</sup> ICH – International Conference on Harmonisation;

<sup>3</sup> FDA – Food and Drug Administration;

<sup>4</sup> EURACHEM – Guia laboratorial para validação de métodos;

<sup>5</sup> USEPA – United States Environmental Protection Agency.

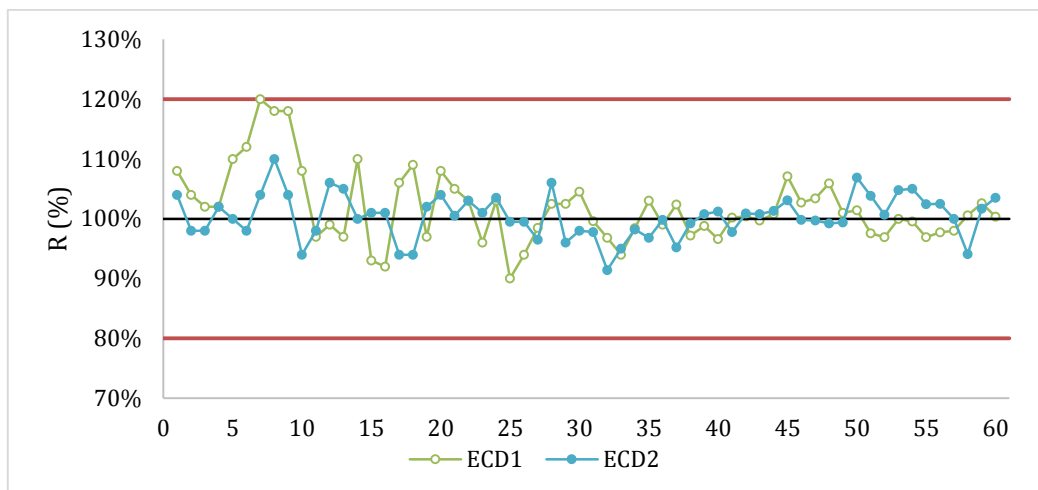


Figura 1.13 - Exemplo de valores de um teste de recuperação de TCA.

### 1.7.3. Gama de Trabalho

É o intervalo entre a concentração inferior e superior do analito, na amostra, entre as quais o método demonstra um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade. A gama de trabalho deve abranger a gama de aplicação para a qual o ensaio vai ser utilizado e a concentração mais esperada ou mais relevante deve, sempre que possível, situar-se no centro da gama de trabalho (Nogueira DQB/FCUL).

Quando é utilizada uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias. De acordo com a norma são recomendados dez pontos de calibração, não devendo ser inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações.

Para o teste de homogeneidade de variâncias determinam-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão, do modo descrito pelas equações seguintes, e aplica-se o teste de Fisher.

$$S_i^2 = \frac{1}{n_i - 1} \sum_{j=1}^m (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2 \quad \text{Eq. 9}$$

Sendo:

$$\bar{y}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^m y_{i,j} \quad \text{Eq. 10}$$

Para  $i = 1$  e  $i = 2$

Com:



$i$  – o número do padrão ( $i$  varia entre 1 e  $m$ );

$j$  – o número de repetição efetuadas para cada padrão.

No teste –  $F$  ou teste de Fisher, o valor  $F$  calculado,  $F$ , é comparado com o valor tabelado,  $F_{crítico}$ , da distribuição de Fisher, para  $N_1 - 1$  e  $N_2 - 1$  graus de liberdade, para determinado intervalo de confiança  $\alpha$ . O valor de  $F$  é calculado de acordo com uma das equações abaixo, dependendo da relação  $S_1^2/S_2^2$  ser maior ou menor que 1 (Relacre, 2000).

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{quando } S_1^2 > S_2^2 \quad \text{Eq. 11}$$

ou

$$F = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad \text{quando } S_2^2 > S_1^2 \quad \text{Eq. 12}$$

A partir do valor de  $F$  calculado, se:

$F < F_{crítico}$  A diferença entre as variâncias não é significativa e a gama de trabalho encontra-se bem ajustada.

$F > F_{crítico}$  A diferença entre as variâncias é significativa e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrão permitam obter  $F \leq F_{crítico}$

#### 1.7.4. Linearidade

A linearidade avalia a capacidade do processo analítico (dentro de determinado intervalo) obter uma resposta que é diretamente proporcional à concentração de analito na amostra. Se o método é linear, os resultados são diretamente, ou através de equação matemática bem definida, proporcionais à concentração de analito e é usualmente expressa como o limite de confiança do declive da regressão linear.

A linearidade pode ser calculada através de um método idêntico à gama de trabalho, calculando-se o valor  $PG$  e comparando-o com o valor tabelado da distribuição de Fisher, sendo:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad \text{Eq. 13}$$

com,

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2 \quad \text{Eq. 14}$$

Onde,

$S_{y/x}^2$  – desvios-padrão residuais da função de calibração linear através do método dos mínimos quadrados;

$S_{y2}^2$  – desvios-padrão residuais da função de calibração não linear.

Ou então, poder-se-á recorrer a uma representação gráfica da função.

Neste caso analisa-se o gráfico da curva de calibração com a função linear representada na Equação 15.

$$y = ax + b \quad \text{Eq. 15}$$

Sendo,

$y$  – Resposta medida;

$x$  – Concentração;

$a$  – Declive da curva analítica (sensibilidade);

$b$  – Ordenada na origem.

E é feito o cálculo do coeficiente de correlação ( $r^2$ ). Quanto mais próximo de 1 for o coeficiente de correlação, melhor a correlação entre a resposta do sistema e a concentração de analito (Machado, 2011) (Bliesner, et al., 2006) (Relacre, 2000).

#### 1.7.4.1. Método dos Mínimos Quadrados

Através deste método demonstra-se que os coeficientes  $a$  (declive) e  $b$  (ordenada na origem) da reta de regressão de  $y$  em  $x$ ,  $y = ax + b$ , são dados por:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^N ((x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y}))}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Eq. 16}$$

e

$$b = \bar{y} - a \times \bar{x} \quad \text{Eq. 17}$$

Sendo:

$x_i$  – valores individuais de concentração;

$y_i$  – valores individuais de sinal do sistema;

$\bar{x}$  – média de valores de  $x$  (concentração dos padrões utilizados);

$\bar{y}$  – média de valores de  $y$  (sinal do sistema)

O desvio padrão residual da reta de regressão pode ser calculado através da Equação 18:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - (ax_i + b))^2}{N - 2}} \quad \text{Eq. 18}$$

Que exprime a dispersão dos valores do sinal do sistema em torno da curva de calibração.

Os desvios padrão do declive  $a$  e da ordenada na origem  $b$ , são dados por:

$$S_a = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 19}$$

$$S_a = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 20}$$

Estes desvios padrão podem ser utilizados para calcular os limites de confiança de  $a$  e  $b$ :

$$a \pm t \times S_a \quad \text{Eq. 21}$$

$$b \pm t \times S_b \quad \text{Eq. 22}$$

sendo  $t$  o valor da variável de Student para o nível de confiança desejado e  $N - 2$  graus de liberdade (Relacre, 2000).

## 1.7.5. Limiares Analíticos

### 1.7.5.1. Limite de Detecção

O limite de detecção de um procedimento individual é a menor quantidade de analito na amostra que consegue ser detetado mas não necessariamente quantificado como um valor exato (Bliesner, et al., 2006).

Uma leitura inferior ao limite de detecção não significa ausência do analito a medir, apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa será inferior a um determinado valor.

Este limite pode ser calculado/determinado, de uma forma geral, de três formas:

- 1ª – Através do desvio padrão residual da curva de calibração;
- 2ª – Através do desvio padrão;
- 3ª – Através da razão Sinal:Ruído (S/N).

### **1ª – Através do desvio padrão residual da curva de calibração**

Quando o método envolve a elaboração de uma curva de calibração, o limiar de detecção pode ser calculado com recurso à Equação 23.

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{a} \times [TCA_3] \quad \text{Eq. 23}$$

Onde,

$S_{y/x}$  – é o desvio padrão residual da curva de calibração (ver 1.7.4.1 Método dos Mínimos Quadrados);

$a$  – declive da curva de calibração;

$[TCA_3]$  – concentração de padrão interno adicionada à amostra (Relacre, 2000).

### **2ª – Através do desvio padrão da amostra**

$$LOD = X_0 + K \times \sigma_0 \quad \text{Eq. 24}$$

Onde,

$X_0$  – representa a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou de padrões vestígio (entre 10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina;

$\sigma_0$  – representa o desvio padrão associado a  $X_0$  (Relacre, 2000).

Se a lei de probabilidade de  $X_0$  é suficientemente conhecida e partindo do princípio que é gaussiana então toma-se o valor de  $K \cong 3,3$ , para um nível de confiança de 99,7%.

### **3ª – Através da razão Sinal:Ruído (S/N)**

Usado por métodos que apresentem ruído na linha de base, comparando sinais de soluções contendo analito e de brancos até que  $S/N = 3$  (Nogueira DQB/FCUL).

## **1.7.5.2. Limite de Quantificação**

O limite de quantificação de um procedimento individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser determinado quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor

concentração. Segundo as recomendações da IUPAC, o coeficiente de variação para estes padrões não deve exceder os 10%.

Também este limite é calculado, geralmente, de três formas:

1ª – Através do desvio padrão residual da curva de calibração;

2ª – Através do desvio padrão;

3ª – Através da razão Sinal:Ruído (S/N).

### ***1ª – Através do desvio padrão residual da curva de calibração***

Quando o método envolve a elaboração de uma curva de calibração, o limiar de quantificação pode ser calculado com recurso à Equação 25.

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{a} \times [TCA_3] \quad \text{Eq. 25}$$

Onde,

$S_{y/x}$  – é o desvio padrão residual da curva de calibração (ver 1.7.4.1 Método dos Mínimos Quadrados);

$a$  – declive da curva de calibração;

$[TCA_3]$  – concentração de padrão interno adicionada à amostra (Relacre, 2000)

### ***2ª – Através do desvio padrão da amostra***

$$LOQ = X_0 + 10 \times \sigma_0 \quad \text{Eq. 26}$$

Onde,

$X_0$  – representa a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou de padrões vestígio (entre 10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina;

$\sigma_0$  – representa o desvio padrão associado a  $X_0$  (Relacre, 2000).

### ***3ª – Através da razão Sinal:Ruído (S/N)***

Usado por métodos que apresentem ruído na linha de base, comparando sinais de soluções contendo analito e de brancos até que  $S/N = 10$  (Nogueira DQB/FCUL).

### 1.7.6. Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas

A precisão divide-se em três componentes:

- 1- Repetibilidade;
- 2- Reprodutibilidade;
- 3- Precisão Intermédia.

#### 1.7.6.1. Repetibilidade

Expressa a precisão de um método fazendo ensaios usando as mesmas condições, no mínimo intervalo de tempo. Podem ser condições tais como:

- Mesmo laboratório;
- Mesmo analista;
- Mesmo equipamento;
- Mesmo tipo de reagentes.

Segundo o guia (Relacre, 2000), um método será repetível se a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio ( $X_i, X_{i-1}$ ), obtidos nas condições acima referidas, não for superior ao limite de repetibilidade ( $r$ ), para uma probabilidade específica.

Para se determinar a repetibilidade de um método no próprio laboratório efetuam-se uma série de medições ( $n > 10$ ) sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade.

A estimativa da variação ( $S_r^2$ ) de um método de análise pode ser determinada pela média ponderada das estimativas de  $m$  séries de análises estudadas nas condições de repetibilidade e é dada por:

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{m=1}^p [(n_{mi} - 1) \times S_{mi}^2]}{\sum_{m=1}^p (n_{mi} - 1)} \quad \text{Eq. 27}$$

Sendo:

$S_{ri}^2$  – variância de repetibilidade associada aos resultados considerados;

$S_{mi}^2$  – variância associada aos resultados;

$(n_{mi} - 1)$  – graus de liberdade da série de análises;

$p$  – número de laboratórios participantes

O limite de repetibilidade ( $r_r$ ) é dado pela seguinte equação:

$$r_r = t_{(n-1, 1-\alpha)} \times \sqrt{2} \times S_r \quad \text{Eq. 28}$$

$S_r$  – desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados (Relacre, 2000).

Para um nível de confiança de 97,5% e 10 réplicas,  $t_{(9, 97,5\%)} = 2,2622$ :

$$r_r = 3,2 \times \sqrt{S_r^2} \quad \text{Eq. 29}$$

Outro método de validação da repetibilidade de um método analítico é feito através do cálculo do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (RSD). Este valor é calculado para cada concentração, é expresso em percentagem. Segundo a AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), o coeficiente de variação, para 10 ppb, deve ser inferior a 15% (AOAC, 2002). Foi definido, de acordo com indicações do Departamento I&D da Amorim & Irmãos, um coeficiente de variação de 10% como critério de aceitação.

$$CV = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Eq. 30}$$

Ambos os critérios podem ser utilizados na avaliação da repetibilidade de um método.

### 1.7.6.2. Reprodutibilidade

Expressa a precisão através de ensaios interlaboratoriais. Os ensaios são sob diferentes condições, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre a mesma amostra, fazendo-se variar condições como:

- Diferente laboratório;
- Diferente operador;
- Diferente equipamento;

Em ensaios interlaboratoriais, a mesma amostra é enviada para diferentes laboratórios onde é analisada. A aceitação ou rejeição é feita através do fator  $z$  – *score* onde:

$$z - score = \frac{|x_i - X|}{S} \quad \text{Eq. 31}$$

Sendo:

$x_i$  – média de cada laboratório;

$X$  – valor “verdadeiro”.

$S$  – o desvio padrão dos resultados

Quando:  $\begin{cases} |z| \leq 2 & \text{O resultado é aceitável.} \\ 2 < |z| < 3 & \text{O resultado é questionável.} \\ |z| \geq 3 & \text{O resultado é insatisfatório.} \end{cases}$

As duas medidas de dispersão referidas representam os extremos da variabilidade de um método de ensaio, sendo a repetibilidade uma medida de variabilidade mínima e a reprodutibilidade uma medida de variabilidade máxima dos resultados. Entre estas medidas extremas existe uma situação intermédia, que se designa por precisão intermédia (Bliesner, et al., 2006) (Ribeiro, 2008).

### 1.7.6.3. Precisão Intermédia

É um processo de avaliação da precisão do método, entre a repetibilidade e a reprodutibilidade, onde são definidas exatamente quais as condições a variar (Bliesner, et al., 2006).

Para determinar a precisão intermédia de um método efetuam-se  $n \geq$  medições em replicado ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas.

Na maioria dos casos, o valor da precisão intermédia é função da gama de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados aberrantes. A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificar a existência de valores aberrantes (Relacre, 2000).

O desvio padrão da precisão intermédia é calculado a partir da seguinte expressão:

$$S_{pi} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad \text{Eq. 32}$$



Sendo:

$S_{pi}$  – desvio padrão de precisão intermédia;

$t$  – número de amostras ensaiadas;

$n$  – número de ensaios efetuados por amostra;

$j$  – número da amostra ( $1 \leq j \leq t$ );

$k$  – número do resultado obtido para a amostra  $j$  ( $1 \leq k \leq n$ );

$y_{jk}$  – resultado individual ( $k$ ) para a amostra  $j$  de 1 a  $t$ .

De forma análoga ao cálculo do limite de repetibilidade, para  $n = 10$  e um nível de confiança de 97,5%, o limite de precisão intermédia ( $r_{pi}$ ) é calculado através de:

$$r_{pi} = 3,2 \times \sqrt{S_{pi}^2} \quad \text{Eq. 33}$$

### 1.7.7. Exatidão

O estudo da exatidão de um método visa avaliar a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro.

A exatidão pode ser avaliada através de vários processos, dependendo dos recursos disponíveis e do tipo de método de ensaio em causa, sendo alguns deles (IPAC, 2007):

- Materiais de Referência Certificados (MRC);

Neste processo, é avaliada a proximidade do valor medido ao valor MRC.

- Ensaios Interlaboratoriais (idêntico a 1.7.6.2 Reprodutibilidade);
- Ensaios de Recuperação.

O recurso mais utilizado para este ensaio, e para a validação de métodos em geral, é o material de referência certificado.

A recuperação está relacionada com a exatidão pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático inerente ao processo. Este erro sistemático ocorre pela perda de substâncias devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (Relacre, 2000).

Deve ser obtida uma taxa de recuperação próxima de 100%, segundo (AOAC, 2002), para 1 ppb, os limites de aceitação da recuperação encontram-se entre 50-120%. Foram definidos como limites, para a taxa de recuperação, o intervalo entre 80 e 120%

A taxa de recuperação é calculada, em percentagem, a partir da Equação 34.

$$R = \left( \frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 34}$$

Onde,

$c_1$  – concentração do analito na amostra fortificada;

$c_2$  – concentração do analito na amostra não fortificada;

$c_3$  – concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Pelos resultados obtidos na recuperação é possível aplicar o teste  $t - Student$ , no qual é comparada a média de recuperação  $\bar{x}$ , valor calculado pela média aritmética dos resultados experimentais em termos de percentagem, com o valor esperado (100%).

$$t_{calc} = \frac{(\bar{x} - \mu) \times \sqrt{n}}{S_{Rec}} \quad \text{Eq. 35}$$

Onde  $n$  é o tamanho da amostra e  $S_{Rec}$  o desvio padrão das médias de recuperação de cada nível de fortificação (NM Cassiano, 2009) (Causon, 1997).

Caso	{	$ t_{calc}  \leq t_{tab}$	Não ficou estatisticamente provada, para determinado nível de confiança, a existência de erros sistemáticos, o ensaio é <b>satisfatório</b> .
		$ t_{calc}  > t_{tab}$	Ficou estatisticamente provada, para determinado nível de confiança, a existência de erros sistemáticos, o ensaio <b>não é satisfatório</b> .

### 1.7.8. Robustez

Robustez é definida como a capacidade de um método analítico permanecer inalterado por pequenas mas deliberadas variações dos seus parâmetros experimentais (e.g. volumes adicionados, composição da fase móvel, temperatura, etc.), fornecendo igualmente uma indicação da confiança do sistema durante o uso normal.

Se se verificar que o método é suscetível a pequenas variações de certos parâmetros nas condições experimentais então as mesmas devem ser controladas e incluídas no procedimento (Bliesner, et al., 2006).

Para determinar a robustez do método, para cada variação de um parâmetro experimental, são realizados dois testes: *teste - F* e *teste - t*.

O *teste - F*, como já foi enunciado no subcapítulo 1.7.3 Gama de Trabalho, avalia a presença de diferenças significativas entre as variâncias de cada um dos testes envolvidos.

Posteriormente, dependendo da existência, ou não, de diferenças significativas entre as variâncias, é realizado o *teste – t* para variâncias desiguais ou para variâncias iguais.

O *teste – t* verifica a existência de diferenças significativas entre os dois ensaios, seguindo conceitos estatísticos para rejeitar ou não uma hipótese nula.

## 1.8. Incerteza de Medição

A expressão da medida de incerteza é essencial, quando os procedimentos e/ou resultados de ensaio, são comparados com outros ou com determinadas especificações.

Uma medição só é considerada objetiva se acompanhada por uma medida da sua qualidade. Sem o conhecimento da medida de incerteza é impossível, para os utilizadores, de determinado resultado analítico, estabelecerem um grau de confiança e garantir comparabilidade entre diferentes medidas de um mesmo parâmetro.

A incerteza é definida no (GUM, 2008) como “um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem com razoabilidade ser atribuídos ao mensurando” e pode ser um desvio padrão (ou um seu múltiplo) ou um intervalo de confiança (EURACHEM/CITAC, 2008).

Na prática, a medida da incerteza é definida pelo intervalo em redor do mensurando, que contém com elevada probabilidade o valor verdadeiro. Na realidade, o valor verdadeiro é sempre desconhecido, mas quando estimado e aceite convencionalmente como valor de referência, este passa a atuar como ponto de referência para a estimativa da incerteza e erro. Assim, a incerteza de medição deve, portanto, ter em conta todo o tipo de erros associados à medição.

É importante distinguir entre erro e incerteza.

O erro é definido como a diferença entre um resultado individual e o valor verdadeiro do mensurando (é um valor único positivo ou negativo), e engloba uma componente aleatória e sistemática. Do mesmo modo que o valor verdadeiro nunca é totalmente conhecido, o erro ao ser função do valor verdadeiro, também nunca é completamente conhecido. Os erros associados às análises quantitativas dividem-se em grosseiros, aleatórios e sistemáticos.

Os erros grosseiros são tipicamente gerados por falhas óbvias do procedimento analíticos, como, falha humana, mau funcionamento de equipamentos, derrame de solução. Erros deste tipo invalidam uma medição. Normalmente estes tipos de erros são fáceis de identificar e não são considerados na estimativa da incerteza de medição (EURACHEM/CITAC, 2008).

O erro aleatório é normalmente gerado por variações imprevisíveis de grandezas que influenciam no resultado de medição. Estes erros afetam a precisão do ensaio e são responsáveis pela dispersão dos resultados do ensaio à volta da média dos mesmos.

Os erros aleatórios não podem ser eliminados, mas podem ser reduzidos, pelo aumento do número de medições replicadas e apresentação da média das medições.

O erro sistemático é definido como um componente de erro que, no decorrer de um número de análises do mesmo mensurando, permanece constante ou varia de uma forma previsível. Estes erros afetam a exatidão, provocam um desvio entre a média das medições e o valor convencionado como verdadeiro. No entanto, estes erros podem ser reduzidos ou eliminados tendo em atenção à escolha do procedimento analítico e do equipamento. Caso seja conhecido o erro sistemático, este pode ser corrigido na medição final.

Para melhor ilustrar o que foi referido apresenta-se a Figura 1.14:

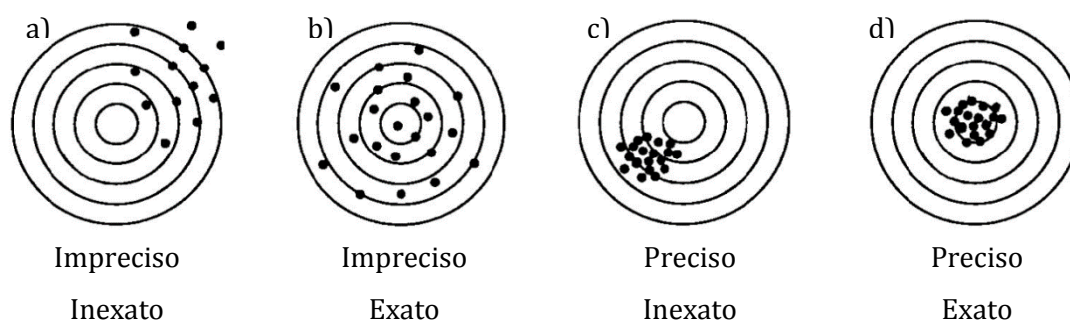


Figura 1.14 - Distinção entre Precisão e Exatidão.

Em termos de erros, podemos distinguir na Figura 1.14 os diferentes tipos, ou seja, em a) temos um Erro Aleatório (EA) e um Erro Sistemático (ES) elevado, em b) temos um EA elevado e um ES baixo, em c), o EA é baixo e o ES é elevado e em d) temos ambos os erros baixos.

Em condições ideais, um método analítico deve ser exato. No caso da Figura 1.14-a), ou seja, impreciso com grandes erros sistemáticos, a realização de uma pequena quantidade de ensaios replicados pode induzir a erros apreciáveis. Um método preciso, como o c), pode ser convertido em exato caso seja possível corrigir o erro sistemático. Assim, a incerteza de medição deve incluir a incerteza resultante dos erros aleatórios e dos erros sistemáticos da medição, de forma a maximizar, com grande probabilidade, o módulo do erro de medição, na medida em que, a incerteza é um valor positivo.

### 1.8.1. Procedimentos da Avaliação da Incerteza

Na Tabela 1.8 encontram-se resumidas as etapas necessárias para se obter uma estimativa da incerteza associada ao resultado de uma medição.

*Tabela 1.8 - Etapas para a quantificação de incertezas, de acordo com o guia (EURACHEM/CITAC, 2008).*

- 1) Especificação do mensurando e do procedimento**
- 2) Identificação das fontes de incerteza**
- 3) Quantificação das componentes de incerteza**
- 4) Conversão das incertezas em incerteza padrão**
- 5) Cálculo da incerteza padrão combinada**
- 6) Cálculo da incerteza expandida**

As metodologias mais seguidas, no cálculo da incerteza em ensaios químicos, são (IPAC, 2007):

- 1) Abordagem “passo a passo”;
- 2) Abordagem baseada em informação interlaboratorial;
- 3) Abordagem baseada em dados da validação e/ou controlo da qualidade do método analítico, recolhidos em ambiente intralaboratorial.

Todas as abordagens utilizadas para a estimativa da incerteza têm em comum as etapas referidas acima e estas são consistentes com os requisitos do guia *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* – (GUM, 2008).

Paralelamente à abordagem “passo a passo”, que é a base de qualquer avaliação de medida de incerteza, surgiram outras abordagens que facilitam o cálculo de incertezas e que foram primeiramente referenciadas em artigos de revistas científicas e no guia da (EURACHEM/CITAC, 2008).

As abordagens implicam que se evidencie que as condições em que decorreram os estudos (ex: tipo de matriz, gama de trabalho) se aplicam e/ou adequam à amostra presentemente em estudo. Qualquer uma das alternativas à abordagem “passo a passo” apresenta a vantagem de permitir, aos laboratórios, calcularem as incertezas sem um esforço adicional elevado. Os guias referidos recomendam que não se efetue um esforço

desproporcional para avaliar as incertezas da medição, e que se utilize os dados de desempenho do método, obtidos aquando da validação do mesmo, e/ou os de controlo de qualidade. A escolha da metodologia para avaliação de incertezas é, portanto, condicionada pela informação disponível.

Caso se verifique que a informação disponível não inclui todas as fontes de incerteza identificadas, deve-se planear uma forma de obter a informação em falta, nomeadamente, recorrer à literatura disponível, certificados, especificações do equipamento, ou planear experiências para obter a informação necessária. Na prática, uma abordagem combinada, entre as fontes de incerteza individuais e a contribuição combinada de todas ou algumas fontes de incerteza é o mais conveniente, e utilizado.

## 1.8.2. Abordagem “Passo a Passo” Combinada com Dados de Validação

A quantificação da incerteza da medição baseada em dados de validação do método, consiste na utilização de parâmetros do desempenho global do método, estimados em ambiente intralaboratorial, para quantificar grande parte da incerteza associada ao ensaio. Habitualmente, a aplicação desta abordagem consiste na combinação das incertezas associadas à precisão e exatidão do método, com fontes de incerteza relevantes que são mantidas constantes na sequência da realização dos ensaios experimentais necessários à quantificação da precisão e exatidão do ensaio (ex: incerteza associada à pureza da substância de referência usada, quando esta é relevante). Nesta abordagem, as componentes de incerteza são combinadas como componentes independentes de uma expressão multiplicativa ou, em caso particulares, como componentes de uma expressão aditiva, dependendo do facto de se considerar numa gama variada ou estreita de concentrações, respetivamente (GUM, 2008).

### 1.8.2.1. Especificação do Mensurando

A especificação da mensurando requer uma indicação clara e inequívoca do que está a ser medido e estabelece a expressão quantitativa que relaciona o valor da mensurando com as variáveis de entrada, ou seja, todos os parâmetros dos quais depende.

O mensurando ( $y$ ) deve ser expressa por uma equação matemática que a relacione a com as grandezas de entrada consideradas relevantes, não correlacionadas ( $x$ ).

$$y = f(x_1, x_2 \dots x_N) \quad \text{Eq. 36}$$

Na especificação do mensurando, ( $y$ ), deve-se identificar o item ensaiado, o analito, a matriz e as condições de medição. Principalmente, em métodos analíticos mais complexos

é também recomendável, que se efetue um diagrama de “causa-efeito” dos vários passos analíticos envolvidos.

### 1.8.2.2. Identificação das Fontes de Incerteza

A forma convencional de identificação das fontes de incerteza é através da elaboração de uma extensiva lista de fontes significativas de incerteza. Nesta etapa, não é necessária a preocupação com a quantificação das componentes individuais. Uma boa estimativa pode ser feita centralizando os esforços nas contribuições maiores para a incerteza global.

A identificação destas fontes é um dos passos de maior complexidade na estimativa da incerteza, pelo que a representação através de um diagrama de causa-efeito, também denominado de diagrama de Ishikawa ou “espinha de peixe”, é muito importante na percepção das fontes que influenciam a incerteza final de um resultado.

Neste diagrama indicam-se todas as fontes de incerteza, bem como a relação entre si e a forma como influenciam a incerteza do resultado. A representação do diagrama de causa-efeito também evita que as mesmas fontes de incerteza sejam quantificadas mais do que uma vez, permitindo o agrupamento de algumas delas.

As fontes de incerteza podem ser originadas por erros sistemáticos ou aleatórios e ser função de diversos fatores, designadamente, a amostragem, as condições de acondicionamento armazenamento, efeitos de matriz e interferentes, efeitos dos instrumentos, pureza dos reagentes, correção de branco, condições ambientais, equipamento de massa e volumétrico, processamento de dados, fatores humanos, etc. (EURACHEM/CITAC, 2008).

### 1.8.2.3. Quantificação das Componentes de Incerteza

A metodologia utilizada para a quantificação de incertezas depende da possibilidade de avaliar a incerteza das componentes individuais, da realização de estudos de validação interna, da participação em ensaios interlaboratoriais, da utilização de materiais de referência certificados, das características intrínsecas ao método (métodos racionais<sup>1</sup>, empíricos<sup>2</sup> e *ad-hoc*<sup>3</sup>) e da experiência do analista.

Existem duas formas de quantificar as fontes de incerteza (EURACHEM/CITAC, 2000).

---

<sup>1</sup> Métodos racionais – Medições destinadas a produzir resultados que são independentes do método utilizado.

<sup>2</sup> Métodos empíricos – Em que os resultados são relatados sem correção ou qualquer tendência intrínseca ao método.

<sup>3</sup> Método *ad-hoc* – Baseados em métodos de referência, ou em métodos internos bem estabelecidos, que não justificam estudos de validação.

1. Tipo A – é baseada no tratamento estatístico de dados experimentais, nomeadamente pelo cálculo da média estatística de séries de observações repetidas.
2. Tipo B – incerteza estimada através de juízos profissionais baseado na informação disponível sobre a sua variabilidade. Informação esta que pode provir de diversas fontes, como, por exemplo, em outros resultados ou dados anteriores, experiência ou conhecimento geral do comportamento ou propriedades de instrumentos e materiais, especificação de reagentes, materiais ou equipamentos, dados produzidos através de certificados de medição e calibração ou através de dados de referência retirados da bibliografia.

Todas as contribuições de incerteza de um resultado  $x_i$  devem ser expressas como incertezas padrão,  $u(x_i)$ , ou seja, desvio padrão, antes de serem combinadas.

Para a incerteza do tipo A, efetuam-se as determinações da: média aritmética (Equação 37) e do desvio padrão de uma amostra de  $n$  resultados (Equação 38) e o erro padrão da média ou incerteza padrão (Equação 39), considerando que os resultados seguem uma distribuição normal.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Eq. 37}$$

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad \text{Eq. 38}$$

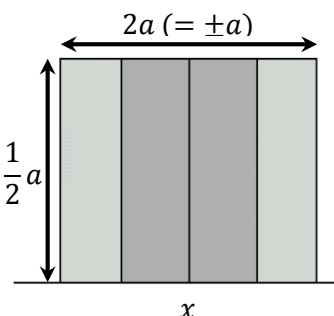
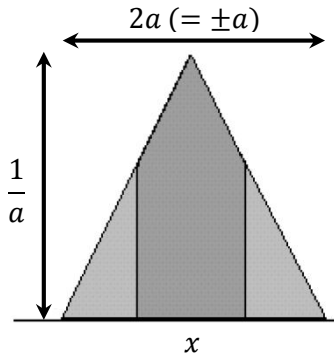
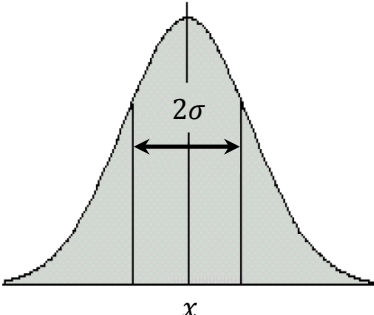
$$u_{\bar{x}} = S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad \text{Eq. 39}$$

Quando se estima a incerteza a partir de uma avaliação do tipo B, a incerteza pode encontrar-se expressa de diferentes formas, e nem sempre está sob a forma de incerteza padrão, ou seja, desvio padrão. Nestes casos, deve ser convertida antes de ser combinada com outras componentes de incerteza. A quantificação da incerteza padrão do tipo B exige prática, experiência e vários conhecimentos.

Assim podemos distinguir as principais distribuições, que devem ser utilizadas de acordo com as circunstâncias, conforme se identifica na Tabela 1.9 (IPAC, 2007) (EURACHEM/CITAC, 2008).



Tabela 1.9 - Tipos de distribuição e sua aplicação relativamente à avaliação da incerteza do tipo B (EURACHEM/CITAC, 2008).

Formato	Distribuição	Incerteza
	<p><b>Retangular</b></p> <p>Utilizar quando:</p> <p>Um certificado ou outra especificação dá limites sem especificar um nível de confiança (p. ex. 25 ml ± 0,05 ml).</p> <p>É feita uma estimativa sob a forma de uma faixa máxima (± a) sem ter conhecimento do formato da distribuição.</p>	$u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}}$
	<p><b>Triangular</b></p> <p>Utilizar quando:</p> <p>A informação disponível quanto a x é menos limitada do que para uma distribuição retangular. Valores próximos de x são mais prováveis do que próximos dos limites.</p> <p>É feita uma estimativa sob a forma de uma faixa máxima (± a) descrita por uma distribuição simétrica.</p>	$u(x) = \frac{a}{\sqrt{6}}$
	<p><b>Normal</b></p> <p>Utilizar quando:</p> <p>É feita uma estimativa baseada em observações repetidas de um processo de variação aleatória.</p> <p>É dada uma incerteza sob a forma de desvio padrão s, um desvio padrão relativo s/n, ou um coeficiente de variância sem se especificar a distribuição.</p> <p>É dada uma incerteza sob a forma de um intervalo <math>x \pm c</math> com determinada percentagem de confiança, sem se especificar a distribuição.</p>	$u(x) = s$ $u(x) = \frac{CV\%}{100} \times x$ $u(x) = \frac{c}{2}, (c \text{ a } 95\%)$ $u(x) = \frac{c}{3}, (c \text{ a } 99.5\%)$

### 1.8.2.3.1. *Incerteza Associada à Concentração de uma Solução Padrão*

A incerteza associada à preparação de uma solução resulta da combinação das seguintes fontes de incerteza:

- 1) Incerteza associada à massa molar;
- 2) Incerteza associada à pureza do padrão comercial;
- 3) Incerteza associada à pesagem;
- 4) Incerteza associada a uma medição de volume.

A abordagem seguida na quantificação desta incerteza da medição é a abordagem “passo a passo”.

#### *1) Incerteza associada à massa molar*

Foram consideradas as incertezas de cada elemento com base numa tabela fornecida IUPAC, onde constam as incertezas para um elevado número de elementos. Esta tabela está disponível no documento (Wieser, et al., 2009)

A incerteza associada à massa molar de cada elemento  $i$  é calculada assumindo uma distribuição retangular:

$$u_{MM_i} = \frac{Incerteza_i}{\sqrt{3}} \quad \text{Eq. 40}$$

#### *2) Incerteza associada à pureza do padrão comercial*

Assume-se uma distribuição retangular para a incerteza padrão associada à pureza do padrão comercial. Esta é calculada da seguinte forma:

$$u_{pur} = \frac{u_{cert}}{\sqrt{3}} \quad \text{Eq. 41}$$

Onde,

$u_{pur}$  – Incerteza associada à pureza do padrão comercial;

$u_{cert}$  – Valor de incerteza dado pelo certificado de análise.

Esta componente só é contabilizada caso a massa pesada do padrão comercial não seja corrigida com o valor da sua pureza, dado pelo certificado de análise do padrão, ou no caso de ser corrigido, o certificado de análise indicar a incerteza associada ao valor da pureza do padrão comercial (por exemplo,  $pureza = 95\% \pm 1\%$ )

### 3) Incerteza associada à pesagem do padrão comercial

Na maioria dos ensaios químicos, a incerteza associada a uma pesagem unitária pode ser estimada através do erro de indicação da balança. Pode-se recorrer ao “Erro Máximo Admissível” (EMA), estabelecido internamente pelo laboratório para cada balança, ou pode-se usar o maior erro de indicação dado pelo certificado de calibração da balança. Habitualmente considera-se que o EMA não deve ser ultrapassado pela soma do módulo do erro de indicação da balança com a incerteza associada à calibração do equipamento. Neste caso, considera-se uma distribuição retangular uniforme associada ao EMA.

Esta equação deverá ter em consideração a incerteza associada a uma pesagem por diferença,  $m = (m_{bruta} - m_{tara})$ . Assim, a incerteza referida anteriormente deverá ser contabilizada duas vezes devido ao facto das duas medições de massa serem independentes em termos de repetibilidade da pesagem e, muitas vezes, também o serem relativamente à linearidade da resposta da balança. Assim, a incerteza associada à pesagem do padrão é dada pela seguinte expressão:

$$u_m = \sqrt{2(u_{Bal}^{Calib})^2} = \sqrt{2\left(\frac{EMA}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Eq. 42}$$

Onde,

$u_{Bal}^{Calib}$  – Incerteza associada à calibração da balança;

EMA – Erro máximo admissível da balança.

### 4) Incerteza associada à medição de volume

A incerteza associada a uma medição de volume é dada pela incerteza associada à calibração de material volumétrico convencional,  $u_V^{Calib}$ , a qual é estimada através da tolerância associada ao valor nominal do seu volume, fornecida pelo fabricante. Normalmente, a tolerância do material volumétrico é fornecida sem nível de confiança e sem qualquer indicação da distribuição associada a esta variável. Nestes casos, considera-se que este volume se rege por uma distribuição retangular.

$$u_V = \sqrt{(u_V^{Calib})^2} = \frac{Tolerância}{\sqrt{3}} \quad \text{Eq. 43}$$

Onde,

$u_V^{calib}$  – Incerteza associada à calibração de material volumétrico;

*Tolerância* – Tolerância volumétrica.

#### 4.1) Incerteza padrão associada a uma diluição de uma solução

Considerando a diluição de um volume inicial  $V_i$  para um volume final  $V_f$ , a incerteza associada,  $u_{dil}$ , associada é calculada pela relação:

$$\frac{u_{dil}}{F_{dil}} = \sqrt{\left(\frac{u_{V_i}}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_f}}{V_f}\right)^2} \quad \text{Eq. 44}$$

Onde  $F_{dil}$  é o fator de diluição, igual a  $V_i/V_f$ .

#### 4.2) Incerteza padrão associada ao efeito da temperatura

Esta incerteza reflete o impacto da variação da temperatura do laboratório na medição. Normalmente, as temperaturas são referenciadas a 20 °C. Quando a temperatura varia num intervalo de  $\pm 4$  °C em relação à temperatura de referência ou quando se efetua uma diluição através de duas medições de volumes sucessivas, normalmente, considera-se que esta componente de incerteza é desprezável e, por isso, pode ser dispensada nestes casos.

Habitualmente, a variação da temperatura do laboratório é descrita por uma distribuição retangular, sendo a incerteza associada ao efeito da temperatura dada por:

$$u_V^{Temp} = \frac{V \times \Delta T \times \alpha}{\sqrt{3}} \quad \text{Eq. 45}$$

Onde,

$\alpha$  – coeficiente de expansão volúmica do líquido ou solvente à temperatura de referência (normalmente 20 °C).

Na prática, quando são utilizadas soluções aquosas diluídas, poderá ser utilizado o coeficiente de expansão volúmica da água  $\alpha = 2,07 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  (IPAC, 2007).

Quando este fator é tido em consideração, a incerteza associada à medição de volume é calculada de acordo com a equação seguinte:

$$u_V = \sqrt{(u_V^{Calib})^2 + (u_V^{Temp})^2} \quad \text{Eq. 46}$$

### 1.8.2.3.2. ***Incerteza Associada à Interpolação na Curva de Calibração***

Considerando que a curva de calibração é descrita de forma adequada pelo método dos mínimos quadrados, a incerteza associada à interpolação do sinal da amostra na curva de calibração ( $u_{reta}$ ) será dado pela seguinte equação:

$$u_{reta} = \frac{S_{y/x}}{a} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_a - \bar{y})^2}{a^2 \times \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 47}$$

Estando  $S_{y/x}$  representado no subcapítulo 1.7.4.1 Método dos Mínimos Quadrados.

Onde,

$S_{y/x}$  – Desvio padrão residual da curva de calibração;

$N$  – número de padrões da reta;

$n$  – número de leituras por padrão;

$a$  – declive da curva de calibração;

$b$  – ordenada na origem da curva de calibração;

$\bar{y}_a$  – valor médio das  $n$  leituras da amostra;

$\bar{y}$  – valor médio das  $N$  leituras dos padrões de calibração;

$x_i$  – concentração de cada  $i$  dos  $N$  padrões de calibração;

$\bar{x}$  – valor médio das concentrações dos padrões de calibração;

### 1.8.2.3.3. ***Incerteza Associada à Precisão***

Habitualmente, nos ensaios químicos a precisão é uma componente maioritária da incerteza global pelo que necessita de ser devidamente avaliada em todo o âmbito de aplicação do método.

De modo a que a incerteza associada à precisão seja o mais realista possível, é recomendável que esta seja avaliada em condições de precisão intermédia, em vez de condições de repetibilidade, visto que a primeira consegue refletir eventuais variações do desempenho do método função de alterações de parâmetros experimentais que habitualmente são mantidos constantes no mesmo dia de trabalho.

A precisão intermédia dum método pode ser quantificada de diversas formas, de entre as quais se destacam três:

- Desvio padrão de resultados replicados de uma amostra ou padrão de controlo, obtidos em condições de precisão intermédia;
- Amplitude média relativa ou absoluta de resultados replicados de diversas amostras;
- Desvio padrão estimado a partir dos limites de controlo de uma carta de controlo de valores individuais baseados em resultados replicados obtidos em condições de precisão intermédia (equivalente à primeira).

Tal como descrito no subcapítulo 1.7.6.3 Precisão Intermédia, e de acordo com o primeiro ponto acima enunciado, a precisão intermédia é calculada reunindo resultados replicados de diversas amostras ou padrões. Desta forma, a incerteza padrão associada à precisão intermédia é calculado através da equação abaixo (IPAC, 2007):

$$u_{PI} = \frac{S'_{PI}}{\sqrt{n}} \quad \text{Eq. 48}$$

Onde,

$S'_{PI}$  – desvio padrão relativo, calculado da seguinte forma:

$$S'_{PI} = \frac{S_{PI}}{\text{Média dos resultados}} \quad \text{Eq. 49}$$

#### **1.8.2.3.4. Incerteza Associada à Exatidão do Método**

O erro de uma medição é a diferença entre o resultado da medição e o valor verdadeiro do mensurando. Este erro resulta da combinação do erro sistemático, que ocorre em todas as medições, com o erro aleatório que possui uma dimensão que varia de ensaio para ensaio. O erro sistemático de uma medição pode ser estimado, com uma incerteza desprezável, pela diferença entre a média de resultados de múltiplos ensaios replicados e o valor verdadeiro do mensurando, uma vez que é minimizado o erro aleatório da medição. Alguns exemplos de itens de referência que podem ser usados para estimar o erro sistemático do ensaio são: materiais de referência certificados, amostras fortificadas ou amostras analisadas por um método de referência.

Em química analítica, a recuperação do método permite quantificar a exatidão do mesmo, podendo ser calculado em termos de recuperação entre o resultado e o valor de referência. Quanto mais próximo de 1 é a recuperação, melhor é a exatidão do método.

A metodologia utilizada para quantificar a exatidão do método depende, como já foi enunciado, dos recursos disponíveis e do tipo de método de ensaio em causa. Esta pode ser calculada através de análise de materiais de referência certificados (MRC), ensaios interlaboratoriais ou através de ensaios de recuperação, com ou sem analito nativo.

Quando a exatidão do método é avaliada através da análise de amostras sem analito nativo às quais foi previamente adicionada uma quantidade conhecida de analito (fortificação ou *spiking*), a recuperação média  $\bar{R}_m$  do método é calculada através da Equação 50:

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}}{C_{fortificada}} \quad \text{Eq. 50}$$

Onde,

$\bar{C}$  – concentração média de uma série de análises de amostra fortificadas;

$C_{fortificada}$  – concentração da amostra fortificada.

Neste caso, a incerteza padrão,  $u_{R_m}$ , associada a  $\bar{R}_m$ , é função da incerteza associada à fortificação da amostra, como apresentado na Equação 51:

$$u_{R_m} = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{S_{obs}^2}{n \times \bar{C}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u(C_{fortificada})}{C_{fortificada}}\right)^2} \quad \text{Eq. 51}$$

Onde,

$S_{obs}$  – desvio padrão de uma série de análises de amostras fortificadas;

$n$  – número de análises da amostra fortificada;

$u(C_{fortificada})$  – incerteza padrão associada ao teor das amostras fortificadas (i.e., associada à fortificação da amostra).

O último termo da Equação 51 ( $u(C_{fortificada})/C_{fortificada}$ ) pode ser tornado desprezável através de uma seleção cuidada dos padrões e das operações gravimétricas e/ou volumétricas envolvidas na fortificação da amostra.

Quando se tem disponíveis resultados da análise de amostras fortificadas a diversas concentrações, pode-se substituir o termo  $(S_{obs}^2/n \times \bar{C}_{obs}^2)$ , da Equação 51, pela variância

associada às recuperações individuais estimadas a dividir pelo número de ensaios realizados ( $S_R^2/n$ ), ficando então (IPAC, 2007):

$$u_{R_m} = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{S_R^2}{n} + \left( \frac{u(C_{fortificada})}{C_{fortificada}} \right)^2} \quad \text{Eq. 52}$$

### *Avaliação da exatidão do método*

Uma vez estimada a incerteza associada à exatidão do método é necessário avaliar se os resultados são afetados por desvios sistemáticos relevantes que necessitem de correção. Esta avaliação pode ser efetuada através de um teste *t – student t*.

Após a quantificação da recuperação média do método,  $\bar{R}_m$ , e da respetiva incerteza padrão  $u_{R_m}$ , é possível avaliar se a recuperação do método, tendo em conta a incerteza padrão da recuperação, é significativamente diferente de 1 através de um teste *t – student*.

$$t = \frac{|1 - \bar{R}_m|}{u_{R_m}} \quad \text{Eq. 53}$$

Se os graus de liberdade associados a  $u_{R_m}$  forem conhecidos,  $t$  é comparado com um valor  $t_{crítico}$  extraído de uma tabela *t – student* bilateral, para o número de graus de liberdade em causa, e um nível de confiança igual a 95%.

Se os graus de liberdade associados a  $u_{R_m}$  forem desconhecidos mas expectavelmente elevados, o  $t$  é comparado com um valor  $t_{crítico}$  igual a 2, produzindo uma comparação com um nível de confiança aproximadamente igual a 95%.

Quando:

- $|1 - \bar{R}_m|/u_{R_m} \leq t_{crítico}$ , a recuperação do método,  $\bar{R}_m$ , **não é significativamente diferente de 1** (i.e., 100%), e habitualmente, não se procede à correção dos resultados dos ensaios em termos de exatidão.
- $|1 - \bar{R}_m|/u_{R_m} > t_{crítico}$ , a recuperação do método,  $\bar{R}_m$ , **é significativamente diferente de 1** (i.e., 100%), e habitualmente, procede-se à correção dos resultados dos ensaios em termos de exatidão.

Se a  $\bar{R}_m$  **não é significativamente diferente de 1**, considera-se que  $\bar{R}_m$  é igual a 1 e a incerteza padrão,  $u_{R_m}$ , é equivalente à incerteza padrão relativa  $u'_{R_m}$ .



Se a  $\bar{R}_m$  é **significativamente diferente de 1** e os resultados dos ensaios são corrigidos em termos da exatidão do método, considera-se  $\bar{R}_m$  estimada experimentalmente para o cálculo de  $u'_{R_m}$  (GUM, 2008):

$$u'_{R_m} = \frac{u_{R_m}}{\bar{R}_m} \quad \text{Eq. 54}$$

#### 1.8.2.4. Incerteza Padrão Combinada

O cálculo da incerteza padrão combinada baseia-se na Lei da Propagação das Incertezas (GUM, 2008). As componentes de incerteza padrão relativa estimadas a partir dos dados de validação da qualidade do ensaio podem ser contabilizadas como componentes independentes de uma expressão aditiva. A incerteza padrão combinada de uma determinada grandeza  $y$ , é então, segundo esta lei, seguindo a equação abaixo:

$$u(y) = y \times \sqrt{\left(\frac{u_X}{X}\right)_i^2 + \dots + \left(\frac{u_X}{X}\right)_n^2 + (u_K)_j^2 + \dots + (u_K)_m^2} \quad \text{Eq. 55}$$

#### 1.8.2.5. Incerteza Expandida

A incerteza expandida, simbolicamente representada por  $U(y)$ , é a medida da incerteza dada para uma função de distribuição de probabilidade apropriada ao resultado (distribuição normal), para um nível de elevada confiança (normalmente de aproximadamente 95% ou 99%). A incerteza expandida é igual à incerteza combinada multiplicada por um coeficiente ou fator de expansão, normalmente situado entre 2 e 3.

$$U(y) = k \times u(y) \quad \text{Eq. 56}$$

Sempre que as incertezas associadas à precisão e à exatidão são estimadas recorrendo a um número elevado de ensaios experimentais, a incerteza expandida combinada pode ser estimada, para um nível de confiança aproximadamente igual a 95%, multiplicando  $u(y)$  por um fator de expansão  $k$  igual a 3. Quando a precisão ou exatidão é estimada com base num número reduzido de ensaios experimentais (menor que 6), sugere-se a utilização de um fator de expansão extraído de uma tabela  $t$  – *student* bilateral para um nível de confiança igual a 95% e um  $n$  igual ao menor número de ensaios, efetuados para quantificar a precisão ou a exatidão do método (GUM, 2008).

### 1.8.2.6. Expressão dos Resultados

A expressão de resultados com incerteza deve ser apresentada, segundo (GUM, 2008), deve ser representado como:

$$\textit{“Resultado} = y \pm U [\textit{unidades}] \quad \text{Eq. 57}$$

A incerteza reportada é uma incerteza expandida calculada utilizando um fator de expansão igual a  $k$ , o que permite associar ao resultado um nível de confiança de  $X$ ”.

## 1.9. Empresa – Corticeira Amorim, S.G.P.S., S.A.

O grupo Amorim é internacionalmente conhecido no sector da cortiça.

Iniciou as suas atividades em 1870 por António Alves de Amorim, com o objetivo de produzir rolhas para os barris de Vinho do Porto. Todavia, apenas em 1927 dá-se a constituição formal do grupo. É formada a Amorim & Irmãos em Santa Maria de Lamas, empresa que irá dar origem a todas as organizações seguintes pertencentes ao universo atual da Corticeira Amorim. A primeira metade do Século XX é caracterizada pelo seu crescimento contínuo, apenas interrompido pela eclosão da Segunda Guerra Mundial. Com a alteração do contexto económico global após a grande guerra, o grupo Amorim inicia desta forma um forte ritmo de expansão internacional e diversificação de áreas de negócio. Foi maioritariamente neste cenário que o grupo exerceu as suas atividades na segunda metade do Século XX. Em 2005 dá-se a aquisição da Unidade Industrial Equipar, sob a qual se insere o projeto de dissertação.

Atualmente a Corticeira Amorim é líder mundial destacado no sector da cortiça, presente em 75 países de todos os continentes, sendo Portugal o país com maior área mundial de crescimento de sobreiros com cerca de 715 mil hectares (34% do total mundial) e uma capacidade extrativa de 100 mil toneladas/ano (49,60% da capacidade mundial).

A Corticeira Amorim, S.G.P.S. está dividida em 3 grandes Áreas de Negócio (Figura 1.15): Amorim Natural Cork, Amorim Cork Research, e Amorim Cork Composites, que confere à organização um elevado nível de integração vertical. Atualmente as aplicações da cortiça não incluem apenas produtos tradicionais como a rolha, pelo que esta verticalidade permite à empresa abranger a maioria das suas aplicações como pavimentos e revestimentos de cortiça, artigos decorativos, artigos para aplicações na indústria automóvel, militar e aeroespacial, para produtos químicos para fins farmacêuticos, entre outros (Roberto, 2011) (Amorim & Irmãos, S.A., 2011).

A Amorim & Irmãos, S.G.P.S, S.A. é a unidade de negócio que produz e comercializa rolhas e é constituída por 8 unidades industriais, onde se insere a Unidade Industrial Equipar, adquirida pelo grupo em 2005.

A Amorim & Irmãos, S.G.P.S., S.A. é a maior produtora e fornecedora de rolhas de cortiça a nível mundial, registando uma produção média anual de 3 mil milhões de unidades. A UI-Equipar é a maior produtora de rolhas aglomeradas e técnicas do mundo com uma capacidade de produção de cerca de 5 milhões de rolhas por dia, empregando cerca de 170 trabalhadores.



Figura 1.15 - Organograma da empresa Corticeira Amorim S.G.P.S., S.A..

### 1.9.1. Unidade Industrial Equipar

A Unidade Industrial Equipar divide-se em quatro secções:

- i. Trituração – produção de granulados;
- ii. Aglomerada – produção de rolhas de cortiça aglomerada;
- iii. Twin-top – produção de rolhas técnicas com disco;
- iv. Distribuição – marcação e tratamento de rolhas.

### 1.9.1.1. Produtos

#### **Granulado**

*Tabela 1.10 - Diâmetros do granulado produzido na UI Equipar.*

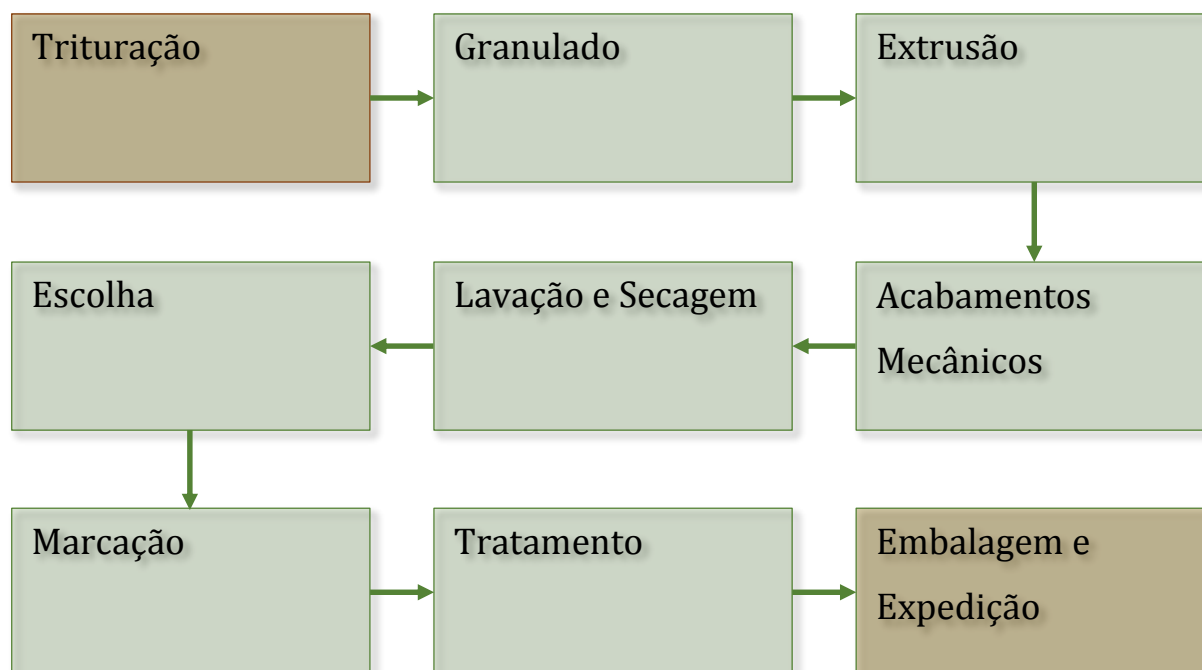
Granulado	Intervalo de diâmetros (mm)	
<b>RCT</b> (Rolha Champanhe e Técnica)	3 – 7	Granulado de cortiça de maior granulometria.
<b>RA</b> (Rolha Aglomerada)	2 – 3	Granulado de granulometria intermédia.
<b>RN</b> (Rolha Neutrocork®)	1 – 2	Granulado de cortiça de granulometria fina.
<b>MD/BD</b>	0,5 – 1	Granulados não destinados à produção de rolhas, provenientes da trituração da cortiça e representativos da sua fração de menor dimensão.
<b>AD</b>	0,5 – 1 1 – 2	
<b>ADT</b>	1 – 2	

#### **Rolha Aglomerada**



A rolha **Aglomerada**, constituída por um corpo aglomerado de cortiça e produtos aglomerantes, é ideal para vinhos de consumo rápido. Responde na perfeição à necessidade de conciliação entre os fatores preço e boa performance (Catálogo-Amorim).

Processo de produção da rolha **Aglomerada**:



*Figura 1.16 - Processo de produção da rolha Aglomerada.*

### ***Rolha Twin Top®***



A rolha **Twin Top®** é uma rolha técnica, baseada na tecnologia de produção da rolha de champanhe. Responde com eficácia às exigências mais elevadas dos vinicultores e mantém todas as propriedades benéficas da rolha de cortiça natural em termos de sustentabilidade.

Ideal para vinhos frutados e aconselhada para vinhos não destinados a um longo período de estágio na garrafa. É constituída por um disco de cortiça natural em ambos os topos e um corpo aglomerado (Catálogo-Amorim).

Processo de produção da rolha **Twin Top®**:

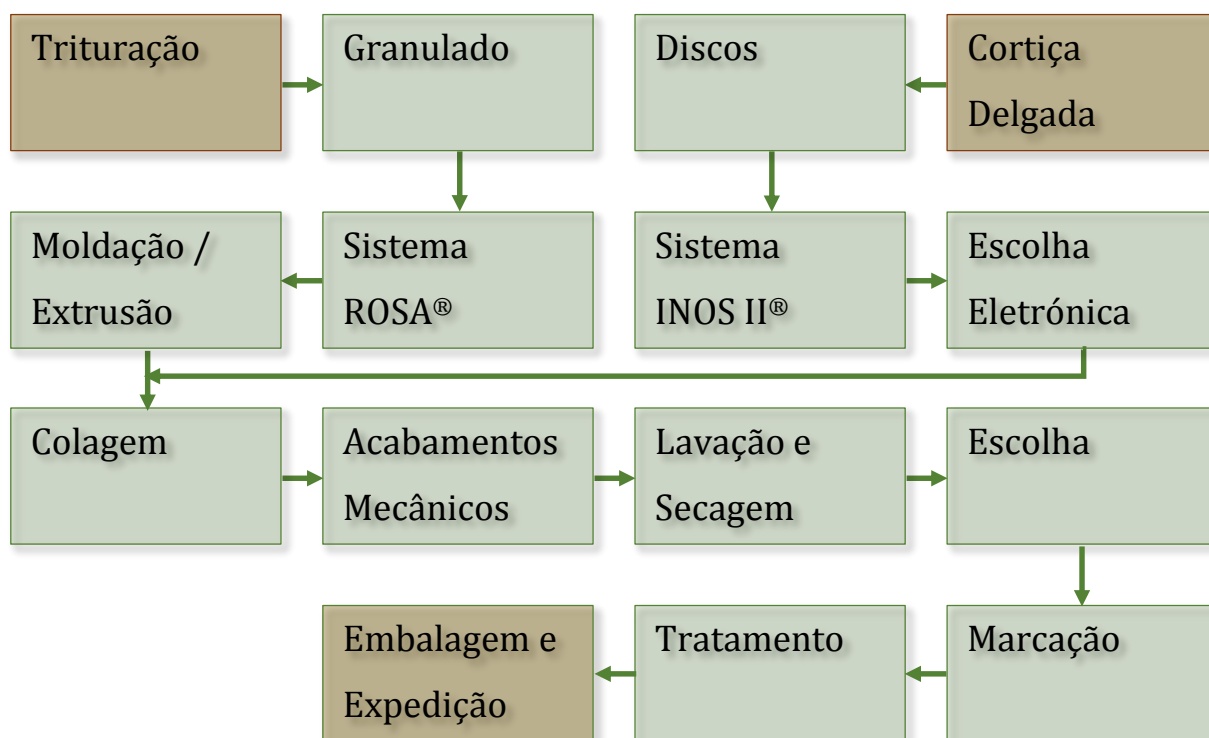


Figura 1.17 - Processo de produção da rolha Twin Top®.

### ***Rolha Advantec® e Advantec Colours®***



Esta inovadora rolha técnica revestida integra todas as medidas preventivas e corretivas de combate ao TCA.

Criada para ser uma referência nos vedantes para vinhos de grande rotação, a rolha **Advantec®** assume-se como uma solução imbatível em termos de preço e desempenho sensorial e técnico (Catálogo-Amorim).



Lançada em 2012, a nova linha **Advantec Colours®** é direcionada para um público jovem e para bebidas de consumo rápido. Esta rolha técnica pretende impressionar o consumidor e dar resposta às necessidades emergentes do mercado, permitindo a combinação da cor da rolha com os elementos decorativos do produto.

Processo de produção da rolha **Advantec®** e **Advantec Colours®**:

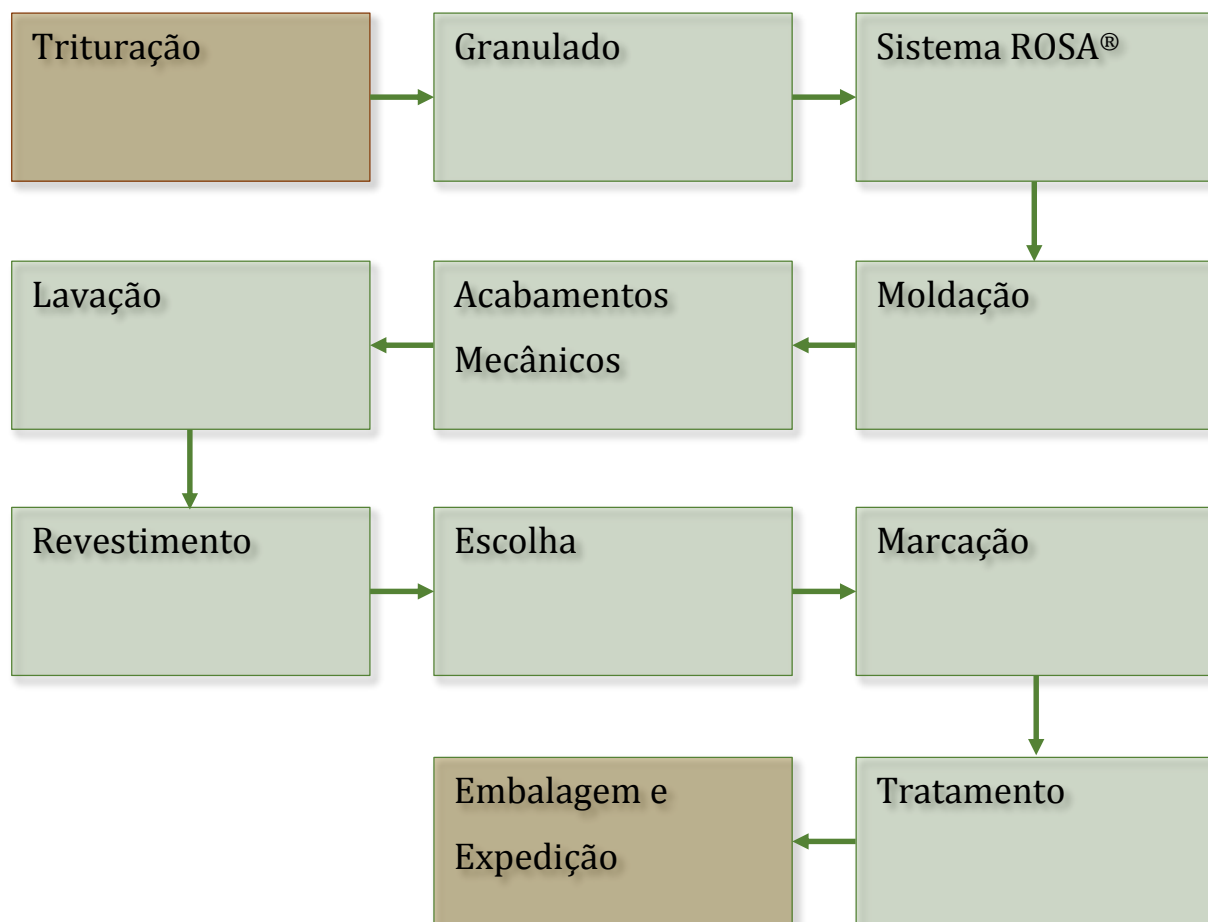


Figura 1.18 - Processo de produção da rolha Advantec® e Advantec Colours®.

### 1.9.2. Importância da Qualidade para a Amorim & Irmãos

Desde o século XVII que o vinho é engarrafado com rolhas de cortiça, sendo que ao não existir alternativas credíveis, era esta a única fonte para vedantes de garrafas. Este facto permitiu à indústria da cortiça monopolizar o mercado das rolhas, tornando-a complacente, não competitiva e incapaz de acompanhar a sua indústria.

Quando, no início da década de 80, o TCA foi finalmente identificado como principal contaminador do vinho pela rolha, produtores de vinho e retalhistas iniciaram uma procura por soluções ou alternativas, que não foi atendida pela indústria corticeira – “nenhuma indústria com 95% a 97% da quota de mercado vai ver a sua propensão para ouvir aumentar, e foi o que aconteceu connosco” – Carlos de Jesus, Diretor de Marketing da Corticeira Amorim.

A complacência da indústria corticeira aliada à contaminação do vinho, pelos seus vedantes, abriu uma brecha. Esta brecha foi aproveitada por empresas que iniciaram a produção de rolhas sintéticas e de tampas de rosca, com a principal vantagem de não contaminarem o vinho.

A entrada dos vedantes sintéticos no mercado teve tal impacto que entre 2000 e 2005, a procura por rolhas de cortiça diminuiu em 20% (segundo relatório da World Wildlife Fund – WWF) e de acordo com a Nomacorc LLC – empresa produtora de rolhas sintéticas – em 2009, cerca de 20% do mercado das rolhas de cortiça foi substituído por vedantes sintéticos e 11% por tampas de rosca.

Estes acontecimentos levaram a uma mudança de atitude na indústria da cortiça.

A Amorim&Irmãos decidiu controlar o processo inteiro, desde a recolha ao produto final, o que levou a empresa a instituir um programa agressivo de reconstrução das suas infraestruturas e a uma aposta no controlo de qualidade. A empresa assumiu a responsabilidade de todos os passos da manufaturação.

Em 2000, com a abertura de uma unidade de processamento em Ponte-de-Sôr, que processa quase metade da matéria-prima originária de Portugal. Foi nesta unidade que o sistema CONVEX® - um sistema de cozedura dinâmico que impede a contaminação cruzada e produz uma cortiça mais seca e limpa, sendo menos vulnerável à formação de TCA – foi primeiramente utilizado para o tratamento de discos de cortiça. No ano seguinte foi instalada uma unidade semelhante em Coruche, onde o INOS II®, um processo hidrodinâmico de limpeza de discos de cortiça, foi desenvolvido.

O ano de 2003 foi mais um marco na conquista da qualidade para a Corticeira Amorim. Após cerca de 5 anos de investigação, com um investimento superior a 30 milhões

de dólares, foi apresentado o novo sistema ROSA®, um sistema de extração de TCA, que remove cerca de 80% do contaminante. É neste sistema que são tratados todos os grânulos de cortiça (destinados ao fabrico de aglomerados e de rolhas técnicas), assim como os lotes de rolhas naturais que necessitem de tratamento.

Graças a estas medidas preventivas e curativas, a Amorim reduziu drasticamente os níveis de TCA libertável nas rolhas, tendo minimizado a problemática da contaminação do vinho por parte da rolha. Este investimento na investigação e desenvolvimento traduziu-se num aumento da quota de mercado das rolhas de cortiça e num aumento das exportações das mesmas, com as exportações a aumentar cerca de 12% entre 2009 e 2011.

Sob a orientação do Dr. Miguel Cabral, Diretor do Departamento de Investigação & Desenvolvimento, a Amorim tem investido mais de 6 milhões de dólares, desde o ano de 2000, em investigação com o único propósito de melhorar a qualidade do produto (Amorim Cork América, 2007).



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta secção do relatório são apresentados os materiais e os métodos utilizados nos diferentes estudos realizados na quantificação do teor de TCA, para a validação do método. Estes estudos foram feitos através de cromatografia gasosa com detetor por captura eletrónica e extração em fase sólida no espaço de cabeça (HS-SPME-GC/ECD).

As análises cromatográficas foram feitas através de dois equipamentos, o cromatógrafo gasoso GC/ECD-Varian CP3800 e o cromatógrafo gasoso Bruker 436-GC, de ora avante denominados ECD 1 e ECD 2 respetivamente.

### 2.1. Material e Reagentes

#### 2.1.1. Material

- Frascos de boca larga de 0,5 e 2 litros;
- Folha de alumínio;
- Dispensador de sal;
- Frascos de 20 ml para amostras com espaço de cabeça (dimensões: 22,5x74,5 mm);
- Cápsulas magnéticas de 20 mm com septo de silicone;
- Micropipeta automática (Acura 825 auclavable, 20-200 µl);
- Macropipeta automática (VWR Ergonomic High-Performance, 10 ml);
- Pontas para pipetas;
- Fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) 100 µm;
- Coluna apolar BR-5ms com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e uma espessura de filme de 0,25 µm;
- Balança Analítica (Kern, Modelo 770-12);
- ECD 1 – GC/ECD-Varian CP3800;
- ECD 2 – GC/ECD-Bruker 436-GC;
- SPME – Combipal MH01-00B CTC (*Analytics AG*).

#### 2.1.2. Reagentes e Químicos

No estudo dos contaminantes utilizou-se o produto químico 2,4,6-tricloroanisol (concentração de 2 ppb preparada no departamento de I&D da Amorim & Irmãos). Para a quantificação do 2,4,6-TCA recorreu-se ao método do padrão interno, onde foi utilizado o

padrão 2,3,6-tricloroanisol (concentração de 2 ppb preparada no departamento de I&D da Amorim & Irmãos).

Como solvente para a preparação das soluções padrão e dos macerados utilizou-se etanol (96% V/V Puro, Manuel Vieira & C<sup>a</sup> (Irmão) Sucrs, Lda) e água filtrada. Utilizou-se também cloreto de sódio (Vatel – Companhia de Produtos Alimentares S.A.) – sal de cozinha – para promover o equilíbrio dos solúveis para a fase gasosa e sal Merck P.A., 99,5%.

### 2.1.3. Preparação das Soluções Padrão

A solução de TCA de 2 ppb proveniente do departamento de I&D, da Amorim & Irmãos, é diluída para soluções de concentração de 1 ppb e 100 ppt. A partir destas duas soluções, seguindo os volumes representados na (Tabela 2.1), são preparadas as diferentes concentrações, com recurso às pipetas.

*Tabela 2.1 - Volumes para a preparação de cada uma das seis concentrações da curva de calibração.*

<b>V. Amostra</b> (ppt)	<b>V. Padrão</b> <b>Interno<sup>1</sup></b> (μl)	<b>V. Padrão</b> (μl)	<b>V. Solução</b> <b>Alcoólica<sup>2</sup></b> (ml)
0,5	100	50 <sup>3</sup>	10
1		100 <sup>3</sup>	
2		200 <sup>3</sup>	
5		50 <sup>4</sup>	
10		100 <sup>4</sup>	
20		200 <sup>4</sup>	

## 2.2. Metodologia

### 2.2.1. Objetivo

A extração do 2,4,6-tricloroanisol (TCA) é realizada sem modificação da matriz líquida através do método de microextração em fase sólida por exposição no espaço de cabeça (SPME) com a ajuda de uma fibra utilizada por norma para absorções de compostos voláteis ou de baixo peso molecular. Os compostos absorvidos são desorvidos e analisados

<sup>1</sup> Da solução de concentração 20 ppt (ng/l)

<sup>2</sup> Solução alcoólica 12% etanol

<sup>3</sup> Da solução de concentração 100 ppt

<sup>4</sup> Da solução de concentração 1 ppb (μl)

numa coluna capilar de baixa polaridade (apolar). A detecção e quantificação são feitas por captura eletrônica (ECD) para analisar os compostos numa matriz líquida.

### 2.2.2. Macerações

#### ***Rolhas***

Num frasco de 500 ml colocar 9 rolhas – se o diâmetro for igual ou superior a 25 mm – ou 12 – se o diâmetro for inferior a 25 mm – e completar o volume com solução etanólica a 12%. Deixar em maceração durante 24 horas à temperatura ambiente. No caso de rolhas técnicas sem peças naturais (ex: Neutrocork, Aglomerada, Advantec, etc.), a maceração durante 24 horas à temperatura ambiente poderá ser substituída por maceração durante 6 horas a 30°C.

#### ***Discos***

Os discos são analisados através de análise sensorial. As macerações identificadas com *off-flavour* são analisadas pelo equipamento de cromatografia gasosa.

#### ***Granulado***

Colocar, num frasco de 500 ml, granulado até ao limite do frasco, perfazendo o volume com solução etanólica a 12%. Não deixar espaço livre entre o macerado e a tampa do frasco, aplicando-se uma folha de alumínio no topo da maceração. Deixar em maceração durante 50 minutos a 30 °C

#### ***Aparas***

Cortar a apara em pequenos pedaços e colocar num frasco de 2 litros, com uma quantidade suficiente para ocupar o volume aproximado de 50 rolhas 45x24 mm. Adicionar ao frasco solução etanólica a 12% até perfazer o volume total. Deixar em maceração durante 50 minutos, a uma temperatura de 40 °C.

### 2.2.3. Preparação das Amostras de Macerado

Pipetar 10 ml da maceração para o *vial* de cromatografia de 20 ml com  $\pm 3$  g de sal (onde é forçado o equilíbrio dos solúveis para a fase gasosa) e adicionar 100  $\mu$ l de padrão interno. De seguida verificar o nível de líquido em cada *vial*, observando a sua uniformidade entre *vials*.

Em cada cromatógrafo é incluído um branco, no primeiro lugar, no início de cada dia. São colocadas três amostras padrão – 2, 5 e 10 ppt – no início de cada tabuleiro.

## 2.2.4. Consumíveis

As fibras são submetidas a um condicionamento antes da primeira utilização, durante 30 minutos, a 280 °C (de acordo com as indicações do fornecedor). As operações de limpeza, substituição e calibração dos diversos consumíveis são feitas quando necessários.

## 2.2.5. Condições Operatórias

### 2.2.5.1. Extração – SPME

A fibra de sílica fundida com revestimento polidimetilsiloxano (PDMS) 100 µm, é, após a pré-incubação da amostra, de 2 minutos sob agitação, exposta no espaço de cabeça do *vial* durante 8 minutos, a 50 °, onde se dá a adsorção.

Os voláteis são termicamente desorvidos da fibra para o injetor do cromatógrafo a 90 °C. A fibra fica no injetor durante 4 minutos, em modo *splitless*, fechando a válvula após 2 minutos (Irmãos, 2014).

### 2.2.5.2. Análise Cromatográfica – GC/ECD

As análises cromatográficas foram realizadas recorrendo a dois cromatógrafos gasosos, o equipamento GC-Varian CP3800 e o Bruker 436-GC, com colunas de cromatografia capilar BR-5ms com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e uma espessura de filme de 0,25 µm. Como gás de arraste utiliza-se o hélio qualidade 2, com um grau de pureza bastante elevado, com um fluxo de coluna de 1,0 ml/min a uma pressão constante de 20,7 psi. O gás de limpeza utilizado, para os detetores, é azoto de qualidade 2 com alta pureza. Ambos os gases apresentam uma pureza mínima de 99,999%.

Relativamente ao programa de temperaturas, seguiu-se o mesmo procedimento para todas as análises realizadas. Cada análise teve o início à temperatura de 90 °C, começando, desde logo, o aquecimento a uma taxa de 15 °C/minuto, até atingir 265 °C, mantendo esta temperatura por 0,33 minutos. O tempo total da análise cromatográfica é de 12 minutos. A rampa de temperaturas do forno da coluna encontra-se representada na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Rampa de temperatura do forno.

Temperatura (°C)		Rácio (°C/min)	Tempo (min)	Tempo total (min)
Inicial	90	–	0	0
Final	265	15	0,33	12

O detetor encontra-se a uma temperatura de 280 °C.

## 2.2.6. Parâmetros Experimentais

Este capítulo teve como principal objetivo verificar os parâmetros obtidos em artigos de otimização do processo de detecção e quantificação de compostos causadores de desvios organolépticos, através de cromatografia gasosa com microextração em fase sólida no espaço de cabeça, e compará-los aos parâmetros do método seguido pelo laboratório de qualidade da UI Equipar. Os parâmetros analisados foram o teor de álcool da solução hidroalcoólica, o tipo de fibra utilizado na extração SPME, a adição de sal à amostra e as condições de extração (temperatura e tempo de extração).

### 2.2.6.1. Teor de álcool (v/v)

Os coeficientes de partição entre a fase líquida e a fibra são bastante dependentes da matriz, pelo que em análises de vinho é necessário ter em conta o teor de álcool, pois sendo este um componente maioritário do vinho, pode interferir com a extração de TCA pela fibra.

Já ficou demonstrado por (Urruty, et al., 1996) que o aumento do teor de etanol na solução irá diminuir o coeficiente de partição dos componentes voláteis na matriz e a sua sensibilidade, diminuindo a razão Sinal/Ruído (S/N). Este facto é verificado nos artigos (Insa, et al., 2004), (Insa, et al., 2006) e (Riu, et al., 2002).

Tendo em conta que um dos mais comuns teores de etanol no vinho é de 12 %, é este o teor de álcool maioritariamente utilizado na preparação das amostras, sendo também a concentração utilizada no método seguido pelo laboratório de qualidade da UI Equipar.

### 2.2.6.2. Escolha do tipo de fibra

Os polímeros de revestimento das fibras mais comumente estudados para a otimização da extração de compostos orgânicos voláteis são o polidimetilsiloxano (PDMS) 100 µm, o PDMS-divinilbenzeno (PDMS-DVB) 65 µm, o DVB-carboxeno-PDMS (DVB-CAR-PDMS) 50/30 µm e o poliacrilato (PA) 85 µm. Apesar de a fibra de DVB-CAR-PDMS apresentar melhor sensibilidade (Riu, et al., 2002), (López-Vidal, et al., 2005), a fibra de PDMS apresenta melhor repetibilidade, sendo esta a fase estacionária mais comumente utilizada, incluindo o laboratório da UI-Equipar (Vlachos, et al., 2007) (Neto, et al., 2007) (Insa, et al., 2004) (Insa, et al., 2007) (Demyttenaere, et al., 2003) (Lizagarra, et al., 2004) (Jönsson, et al., 2006) (Holopainen, et al., 2013).

### 2.2.6.3. Adição de sal

A adição de sal (NaCl) à amostra irá aumentar a força iónica da mesma, pelo que as substâncias orgânicas tornar-se-ão menos solúveis, aumentando a quantidade de composto libertada para o espaço de cabeça e, consequentemente, para a fibra aumenta.

Sendo a solubilidade do sal na água relativamente constante para uma elevada gama de temperaturas (cerca de 3,6 g<sub>NaCl</sub>/10 ml<sub>água</sub>), uma vez que o volume de solução é 10 ml, 88% água (v/v) e o sal apresenta uma solubilidade bastante baixa em etanol, a saturação de sal dar-se-á a cerca de 3 g, é de esperar que seja este o valor ótimo de sal na amostra, utilizado em diversos estudos de otimização (Vlachos, et al., 2007) (Özhan, et al., 2009) (Demyttenaere, et al., 2003) (Jeleń, et al., 2013).

No entanto, apesar de se verificar um melhoramento substancial da extração com a adição de sal nas preparações, (Insa, et al., 2006) acredita que uma vez que o etanol altera os coeficientes de partição entre a fase aquosa e o espaço de cabeça, a eficiência da extração é reduzida quando o sal aumenta, facto também reconhecido por (Demyttenaere, et al., 2003).

Segundo o método seguido pelo laboratório são adicionados 3 gramas. Para aferir a quantidade exata de sal adicionado pelo dispensador de sal, em cada *vial*, foram tarados e pesados 70 *vials*. Os resultados encontram-se na Tabela 2.3:

*Tabela 2.3 - Resultados do estudo realizado para aferir a quantidade de sal adicionado pel dispensador, em cada vial.*

<i>Vials</i>	<i>Média</i>	<i>S</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>
70	3,60	0,05	3,64	3,16

A média de sal adicionada é de 3,60 g, uma quantidade superior à necessária para saturar a solução alcoólica.

### 2.2.6.4. Condições de extração

#### **1) Tempo de extração**

O tempo de extração corresponde ao tempo em que a fibra se encontra exposta no espaço de cabeça. É um parâmetro bastante importante pois exerce uma influência direta sobre a adsorção dos compostos na fase estacionária da fibra. Como é de esperar, quanto maior o tempo de extração, maior será a quantidade de analito adsorvida pela fibra e, consequentemente, maior será a área do pico no cromatograma, até se encontrar um equilíbrio, onde já todo o analito foi adsorvido, observável na Figura 2.1. Deve-se então encontrar um compromisso entre uma boa extração, que permita bons resultados a nível de

sensibilidade, e um tempo de extração que não conduza a tempos de análise demasiado demorados.

São vários os autores que, tendo em conta este compromisso, optam por um tempo de extração de 20/30 minutos. (Vlachos, et al., 2007) (Insa, et al., 2004) (Jönsson, et al., 2006) (Jeleń, et al., 2013).

## 2) Temperatura de extração

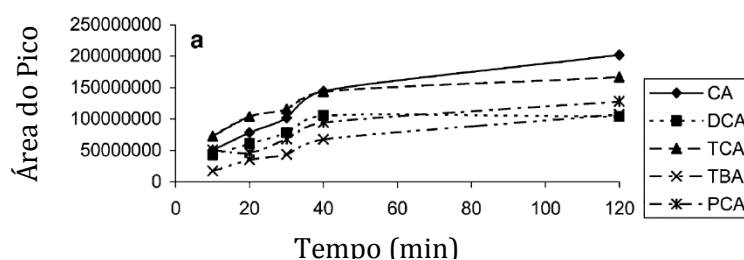


Figura 2.1 - Resultados da influência do tempo de extração na quantidade de analito extraído (López-Vidal, et al., 2005).

Tal como o tempo de extração, também a temperatura da amostra é um parâmetro importante pois permite o controlo da vaporização das moléculas, tal como a sua retenção na fibra. Quanto mais elevada a temperatura de extração, maior a eficiência da extração. No entanto, segundo (López-Vidal, et al., 2005) e (Insa, et al., 2004), a temperatura de extração atinge um limite a partir do qual a extração apresenta menos eficiência, observável na Figura 2.2.

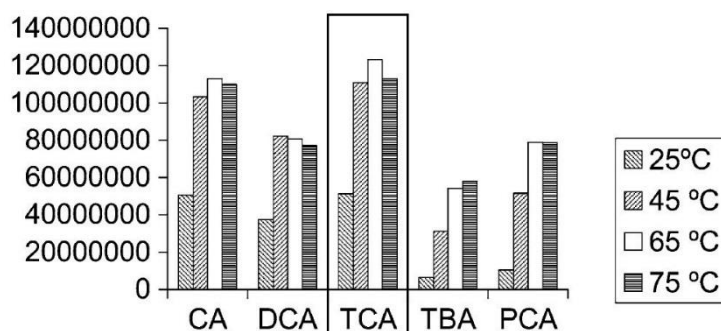


Figura 2.2 - Resultados da influência do tempo de extração na quantidade de analito extraído (López-Vidal, et al., 2005).

Segundo (Insa, et al., 2004) a temperatura ótima de extração é de 55 °C e para (López-Vidal, et al., 2005), é de 65 °C.

Como já foi referido, segundo a metodologia seguida pelo laboratório, o tempo de extração é de 8 minutos, de forma a reduzir o tempo de cada amostra, e a temperatura de extração é de 50 °C.

### 2.2.6.5. Potência de Aquisição

A potência de aquisição diz respeito à frequência com que o cromatógrafo lê pontos por segundo (Hz) e é de especial importância quando se trabalham com gamas de analito perto do limite de detecção.

Quanto mais alta for a potência de aquisição, maior será o número pontos por pico e consequentemente o pico apresentará maior resolução, aproximando-se de uma distribuição gaussiana (Figura 2.3-a)). No entanto, uma maior frequência na leitura aumenta a quantidade de ruído eletrônico (ruído de frequência alta) da linha de base, o que dificulta a leitura de picos menores. Trabalhando a potências de aquisição inferiores o ruído eletrônico é reduzido, fazendo com que a leitura de picos menores seja possível (Figura 2.3-b)).

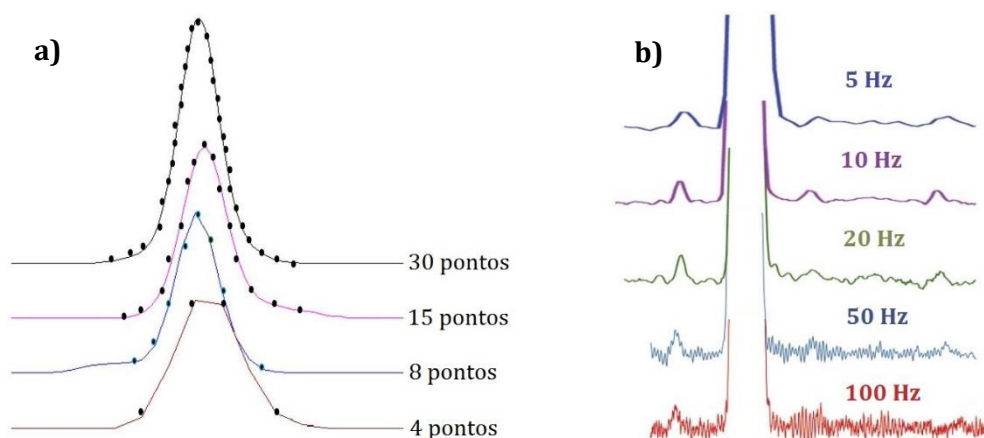


Figura 2.3 – Influência da potência de aquisição na forma do pico.

Como é possível ver na Figura 2.3-a), comparando os picos, é fácil verificar-se que o pico com apenas 4 pontos apresenta um topo mal definido, tornando difícil julgar o topo do pico, e consequentemente, o seu tempo de retenção. Observa-se também que é ligeiramente mais largo que os restantes, o que se deve à má definição do início e fim do pico. Com 15 pontos, o pico já apresenta uma boa definição, onde é possível determinar o seu tempo de retenção.

Por estas razões, é importante encontrar um equilíbrio entre uma boa resolução do pico, para se garantir uma boa leitura, e de uma linha de base com pouco ruído, que permita a leitura de picos menores.

Além das consequências na linha de base e na definição do pico, a potência de aquisição também influencia o tamanho do ficheiro de cada resultado cromatográfico, que aumenta de tamanho com o aumento da potência de aquisição. Este aumento traduz-se em mais espaço ocupado, o que tornará a análise dos dados mais lenta.



Geralmente a prática considerada “segura” é garantir que a potência escolhida rende 10-15 pontos por pico. Se o objetivo for maximizar a relação Sinal:Ruído (menor LOD), deve-se operar com potências mais perto dos 5 pontos por pico.

## **2.3. Validação do Método – Procedimentos**

Para a validação do método foram realizados estudos no que diz respeito à linearidade, através das curvas de calibração, aos limiares analíticos, à precisão do método, através da repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia, à exatidão, através de estudos de recuperação, e em relação à robustez.

### **2.3.1. Linearidade**

Para o estudo da linearidade procedeu-se, para cada ECD:

- à preparação de um mínimo de 10 réplicas de sete amostras padrão – 0,0, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 ppt;
- à medição no equipamento analítico, sob as mesmas condições;
- à construção do gráfico de calibração que relaciona o sinal do equipamento com a concentração.

A avaliação da linearidade é então feita através do cálculo e análise do coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ).

### **2.3.2. Limiares Analíticos**

Como já foi referido no subcapítulo (1.7.5 Limiares Analíticos), os limiares analíticos são calculados com base nas retas de calibração. O procedimento de obtenção destas retas já foi enunciado no subcapítulo 2.3.1 Linearidade.

### **2.3.3. Gama de Trabalho**

A gama de trabalho do método será o intervalo de concentrações de TCA onde se verifique que, para cada concentração, o coeficiente de variação é inferior a 10%, e onde os resultados apresentam boa precisão e exatidão.

### **2.3.4. Precisão**

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade, reprodutibilidade e da precisão intermédia.

#### 2.3.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada sob as condições pré-estabelecidas pela norma ISO 5725-2 (mesmo analista, mesmo tipo de reagentes, etc.), num curto espaço de tempo e com um elevado número de medições para cada nível de concentração.

Para este estudo realizaram-se dez réplicas de seis amostras padrão de diferentes concentrações (0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 ppt), para cada ECD. O modo de preparação das amostras padrão está descrito no subcapítulo 2.1.3 Preparação das Soluções Padrão.

#### 2.3.4.2. Reprodutibilidade

Segundo a norma ISO 5725-2, a reprodutibilidade do método é estudada através de ensaios interlaboratoriais. Os ensaios interlaboratoriais utilizados para este estudo, promovido pela CTCOR, onde, entre outros, participa o laboratório de qualidade da UI Equipar, foram realizados entre 17 de abril de 2014 e 16 de janeiro de 2015.

#### 2.3.4.3. Precisão Intermédia

As variáveis estudadas na precisão intermédia foram diferentes operadores e diferentes equipamentos. Desta forma foram preparadas, a partir de macerações com teores de TCA de níveis diferentes, duas amostras:

- Amostra A – preparada a partir de macerações com teores de TCA perto de 2 ppt;
- Amostra B – preparada a partir de macerações com valores próximos de 10 ppt.

Cada operador preparou três réplicas de cada amostra, por cromatógrafo.

#### 2.3.5. Robustez

Na validação da robustez foram avaliados quatro parâmetros, sendo eles o volume de macerado, o volume de padrão interno, o peso e a qualidade do sal.

Foi então aproveitada uma maceração de apara para a realização do teste. Os valores de cada ensaio estão representados na Tabela 2.4 - Ensaio realizado no estudo da robustez do método.

Tabela 2.4 - Ensaios realizados no estudo da robustez do método.

Ensaio	Volume Macerado (ml)	Padrão Interno (µl)	Sal (g)	Tempo de Maceração (h)
A	10	100	3,6	24
B	<u>9,8</u>	100	3,6	
C	<u>10,2</u>	100	3,6	
D	10	<u>105</u>	3,6	
E	10	<u>95</u>	3,6	
F	10	100	<u>2,5</u>	
G	10	100	<u>2,0</u>	
H	10	100	3,6 <sup>1</sup>	

Para cada ensaio foram analisadas dez réplicas.

<sup>1</sup> Sal P.A. Merck – 99.5%



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A validação desta metodologia consistiu na realização de estudos de forma a avaliar os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, limiares analíticos, precisão, exatidão, gama de trabalho e robustez. No capítulo 7. Anexos encontram-se apresentados todos os resultados experimentais que foram utilizados para a validação do método.

#### 3.1. Especificidade e Seletividade

Tal como descrito nos subcapítulos 1.7.1 Especificidade e 1.7.2 Seletividade, estes parâmetros dizem respeito à capacidade de se identificar e separar, respetivamente, de forma inequívoca o analito, na presença de outros componentes esperados, tal como impurezas e produtos de degradação.

Na Figura 3.1 é possível identificar o pico de 2,4,6-tricloroanisol, e do padrão interno 2,3,6-tricloroanisol, com boa resolução e os seus respetivos tempos de retenção ( $t_{TCA} \cong 6,28$  e  $t_{TCA_3} \cong 6,64$  min).

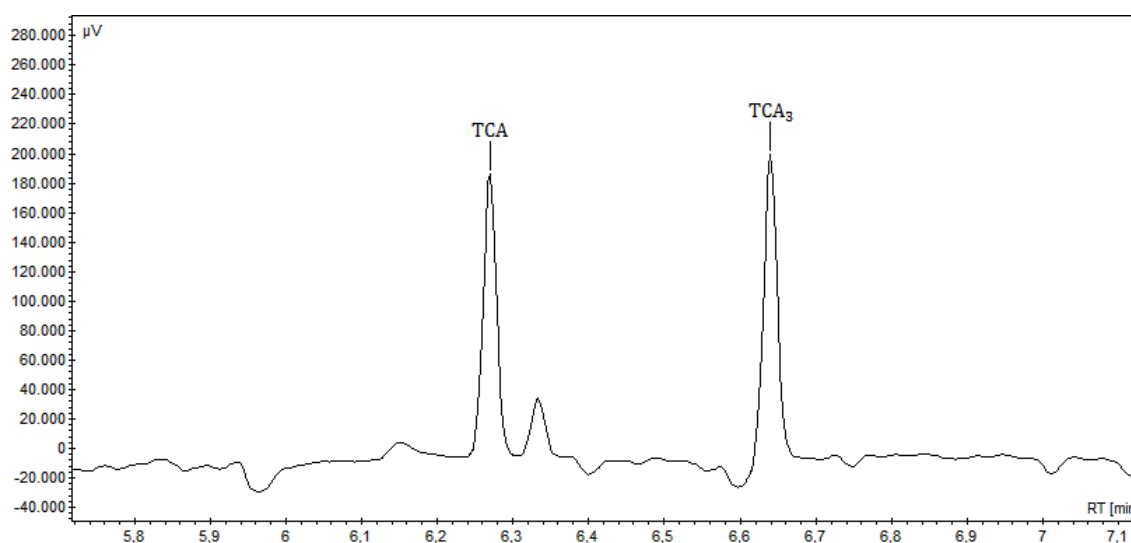


Figura 3.1 - Cromatograma de TCA com uma concentração de 10 ppt.

Segundo (Relacre, 2000), um método pode ser considerado específico e seletivo quando, após se realizar o teste de recuperação, este apresenta bons resultados.

Os resultados deste teste de recuperação estão presentes no subcapítulo 3.5 Exatidão.

## 3.2. Linearidade

A quantificação do TCA com recurso à técnica de SPME pode ser efetuada recorrendo a diferentes métodos de calibração, nomeadamente ao método do padrão interno, da adição de padrão e ao método do padrão externo. O método de calibração seguido foi o método do padrão interno, que visa a utilização de uma referência com características similares à do analito que pode ser adicionada à amostra, padrões e brancos. O sinal da resposta é correspondente à razão entre o sinal do analito e o do padrão interno. Este método permite compensar determinados efeitos que influenciem tanto o analito como a referência, com a mesma intensidade.

Para o estudo da linearidade foram corridas as amostras padrão referentes aos seis pontos da curva de calibração (0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 ppt), com um número mínimo de 10 réplicas, por cromatógrafo. Na sua representação recorreu-se à razão das áreas dos picos de contaminante e do respetivo padrão interno em função da razão das concentrações dos padrões de calibração e da concentração de padrão interno adicionada.

### 1º Teste

O primeiro teste à linearidade foi realizado a 5 de dezembro de 2014, em ambos os cromatógrafos.

As curvas de calibração, do ECD1 e ECD2, utilizadas na leitura dos valores são representadas pelas equações 58 e 59.

$$y = 1,70322x + 0,03764 \quad \text{Eq. 58}$$

$$y = 1,60752x - 0,01317 \quad \text{Eq. 59}$$

Com  $r^2 = 0,9980$  e  $0,9993$ , respetivamente.

Na Tabela 3.1 encontram-se as curvas para as vinte réplicas das amostras padrão dos seis pontos da curva de calibração.

Tabela 3.1 - Curvas de calibração e respectivos limites de detecção e quantificação para ambos os cromatógrafos.

#	ECD1		ECD2	
	Equação da Curva de Calibração	$r^2$	Equação da Curva de Calibração	$r^2$
01	$y = 1,9788x - 0,0011$	0,9909	$y = 1,8317x - 0,0407$	0,9939
02	$y = 1,8454x + 0,0279$	0,9981	$y = 1,6885x - 0,0193$	0,9990
03	$y = 1,8118x + 0,0216$	0,9987	$y = 1,7509x - 0,0266$	0,9992
04	$y = 1,7150x + 0,0453$	0,9980	$y = 1,7483x - 0,0294$	0,9975
05	$y = 1,7988x + 0,0296$	0,9977	$y = 1,6729x - 0,0122$	0,9999
06	$y = 1,8186x + 0,0249$	0,9999	$y = 1,6642x + 0,0050$	0,9998
07	$y = 1,7349x + 0,0348$	0,9998	$y = 1,7723x - 0,0290$	0,9966
08	$y = 1,7994x + 0,0395$	0,9998	$y = 1,7695x - 0,0258$	0,9992
09	$y = 1,7802x + 0,0480$	0,9985	$y = 1,8031x - 0,0291$	0,9983
10	$y = 1,7668x + 0,0499$	0,9986	$y = 1,6902x - 0,0130$	0,9964
11	$y = 1,8457x + 0,0351$	1,0000	$y = 1,7329x - 0,0130$	0,9996
12	$y = 1,8589x + 0,0201$	0,9980	$y = 1,6899x - 0,0123$	0,9989
13	$y = 1,7522x + 0,0493$	0,9993	$y = 1,6724x + 0,0033$	0,9966
14	$y = 1,8966x + 0,0280$	0,9987	$y = 1,7251x - 0,0136$	0,9991
15 <sup>1</sup>	$y = 1,8204x + 0,0341$	0,9989	$y = 1,6672x - 0,0122$	0,9999
16	$y = 1,8402x + 0,0242$	0,9996	$y = 1,7297x - 0,0240$	0,9964
17	$y = 1,8440x + 0,0351$	0,9969	$y = 1,6622x - 0,0026$	0,9994
18	$y = 1,9860x - 0,0007$	0,9979	$y = 1,7038x - 0,0109$	0,9983
19	$y = 1,6851x + 0,0591$	0,9948	$y = 1,7843x - 0,0182$	0,9991
20	$y = 1,8947x + 0,0197$	0,9977	$y = 1,7430x - 0,0088$	0,9977

De acordo com os resultados apresentados o composto apresenta boa linearidade para a gama de concentração estudada. No ECD1 foram obtidas dezoito retas com coeficientes de correlação ( $r^2$ ) superiores a 0,9950, valor correspondente ao critério de aceitação para a curva de calibração poder ser utilizada. No cromatógrafo ECD2, são dezanove as curvas que apresentam  $r^2$  superior ao critério de aceitação. Os valores mais elevados do coeficiente de correlação foram de 1 e 0,9999 para o cromatógrafo ECD1 e ECD2, respetivamente.

É também possível verificar que, nas diversas curvas de calibração, o valor da ordenada na origem é bastante próximo de zero.

As Figura 3.2 e Figura 3.3, servem de exemplo de uma curva de calibração e representam as curvas que apresentaram melhor coeficiente de correlação, para o ECD1 e ECD2, respetivamente.

<sup>1</sup> O cromatograma da réplica 15 do ECD1 não apresentou pico de TCA para o segundo valor da curva de calibração (1 ppt), que se deverá a um erro de pipetagem.

Figura 3.3 - Curva de calibração obtida na réplica 5 do ECD2.

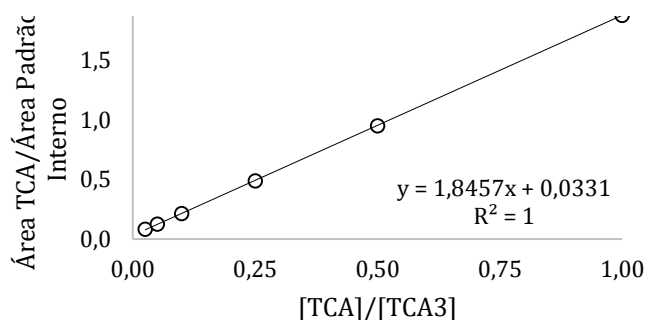
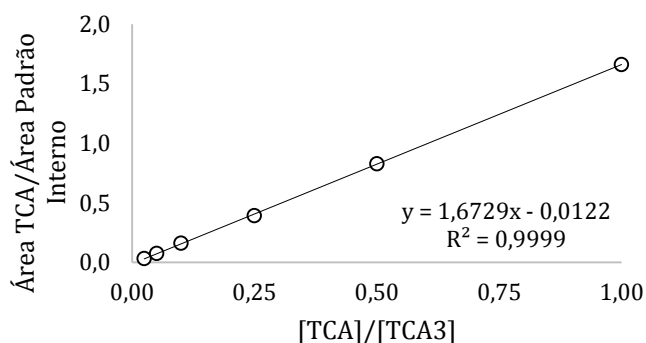


Figura 3.2 - Curva de calibração obtida na réplica 11 do ECD1.



As médias dos resultados obtidos na primeira corrida cromatográfica encontram-se nas Tabela 3.2 e Tabela 3.3, tal como o coeficiente de variação e a recuperação média, para cada um dos níveis de concentração. Foram realizadas 20 réplicas de cada ponto da curva.

Tabela 3.2 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD1.

ECD1						
Padrão (ppt)	0,5	1	2	5	10	20
Média	0,48	1,08	2,16	5,16	10,51	21,37
CV	28,7%	10,2%	8,9%	5,6%	4,7%	4,2%
$\bar{R}_m$	95,9%	108,3%	108,0%	103,2%	105,1%	106,8%

Tabela 3.3 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD2.

ECD2						
Padrão (ppt)	0,5	1	2	5	10	20
Média	0,55	1,11	2,20	5,24	10,39	21,57
CV	7,2%	8,9%	5,3%	4,3%	4,9%	3,2%
$\bar{R}_m$	109,3%	111,1%	110,2%	104,8%	103,9%	107,8%

Apesar de os valores de recuperação médios ( $\bar{R}_m$ ) se encontrarem dentro de um intervalo aceitável (entre 80 e 120%), a média dos resultados tende a ser relativamente superior à esperada. Tal é mais observável na gama dos 20 ppt onde, apesar de em termos de recuperação a diferença ser de apenas 6,8% e 7,8%, para o ECD1 e ECD2 respetivamente, esta diferença traduz-se em cerca de 1,5 ppt.



Os valores dos coeficientes de variação (CV) apresentam valores abaixo dos 10% exceto para as concentrações de 0,5 e 1 ppt, no cromatógrafo 1, onde na gama de 0,5 ppt apresenta um CV de 28,7%. Observa-se, e é de esperar, uma tendência do coeficiente de variação aumentar com a diminuição da gama de valores pois, em valores mais baixos, uma diferença apesar de pequena em número, traduz-se numa diferença grande em termos de percentagem, levando a um CV elevado. No entanto, uma vez que este erro não deve ultrapassar os 10% para o limite de quantificação do método, o mesmo será de esperar para qualquer valor na gama de trabalho estudada. Desta forma, apresentando os resultados alguma diferença entre o valor lido e a concentração esperada, os coeficientes de variação para a gama de 0,5 e 1 ppt no ECD1 serem elevados, e apesar de se terem obtido bons resultados em termos de linearidade, o estudo foi repetido.

## 2º Teste

O segundo teste à linearidade foi realizado a 19 de dezembro de 2014, em ambos os cromatógrafos.

As curva de calibração, do ECD1 e ECD2, utilizadas na leitura dos valores são representadas pelas equações 60 e 61:

$$y = 1,87047x + 8,5668 \times 10^{-3} \quad \text{Eq. 60}$$

$$y = 2,05591x - 0,04572 \quad \text{Eq. 61}$$

Com  $r^2 = 0,9997$  e  $0,9998$ , respetivamente.

Na Tabela 3.4 encontram-se as curvas para as vinte réplicas das amostras padrão dos seis pontos da curva de calibração.

Tabela 3.4 - Curvas de calibração e respectivos limites de detecção e quantificação para ambos os cromatógrafos.

#	ECD1		ECD2	
	Equação da Curva de Calibração	$r^2$	Equação da Curva de Calibração	$r^2$
01	$y = 1,8155x - 0,0100$	0,9957	$y = 2,2090x - 0,1091$	0,9927
02	$y = 1,9926x + 0,0135$	0,9993	$y = 2,2330x - 0,1123$	0,9934
03	$y = 1,7881x + 0,0269$	0,9997	$y = 2,5032x - 0,1583$	0,9820
04	$y = 1,8649x + 0,0228$	0,9996	$y = 2,3802x - 0,1274$	0,9912
05	$y = 1,8894x + 0,0162$	0,9989	$y = 2,4530x - 0,1382$	0,9881
06	$y = 1,9220x + 0,0005$	0,9977	$y = 2,6880x - 0,1771$	0,9809
07	$y = 1,8478x + 0,0251$	0,9994	$y = 2,6673x - 0,1772$	0,9761
08	$y = 1,9480x + 0,0384$	0,9956	$y = 2,7047x - 0,1879$	0,9713
09	$y = 1,8307x + 0,0204$	0,9986	$y = 2,6111x - 0,1744$	0,9780
10	$y = 1,8030x + 0,0489$	0,9990	$y = 2,6800x - 0,1735$	0,9826
11	$y = 1,8556x + 0,0198$	0,9996	$y = 2,6780x - 0,1755$	0,9817
12	$y = 1,8986x + 0,0118$	0,9998	$y = 2,7541x - 0,1982$	0,9686
13	$y = 1,8545x + 0,0046$	0,9969	$y = 2,7943x - 0,1914$	0,9782
14	$y = 1,8409x + 0,0111$	0,9992	$y = 2,8888x - 0,2053$	0,9791
15	$y = 1,9230x \pm 0,0128$	0,9981	$y = 2,7602x - 0,1923$	0,9777
16	$y = 1,8244x + 0,0122$	0,9988	$y = 3,0629x - 0,2409$	0,9668
17	$y = 1,8842x + 0,0133$	0,9987	$y = 2,6668x - 0,1865$	0,9753
18	$y = 1,8384x + 0,0183$	0,9966	$y = 3,1411x - 0,2515$	0,9611
19 <sup>1</sup>	$y = 1,8751x + 0,0085$	0,9990	$y = 2,7689x - 0,1995$	0,9737
20	$y = 1,8581x + 0,0171$	0,9989	$y = 2,3534x - 0,1333$	0,9890

O composto apresenta uma boa linearidade no cromatógrafo ECD1, na gama de concentração estudada. Foram obtidos coeficientes de correlação sempre superiores a 0,9950, e os valores da ordenada na origem são bastante próximos de zero.

No ECD2, a linearidade do composto é menor. Os valores do coeficiente de correlação são mais baixos, sendo sempre inferiores a 0,9950 e com valor mais baixo de 0,9668. Estes resultados são explicados com os valores presentes na Tabela 3.6, onde se pode verificar que as recuperações médias são bastante diferentes de 100%, com três dos pontos da reta – 2 ppt, 5 ppt e 20 ppt – a terem valores de  $\bar{R}_m$  fora do intervalo de aceitação. Os valores da ordenada na origem para este cromatógrafo são consideravelmente diferentes de zero, pelo que para uma amostra branca ( $x = 0$ ), a resposta da equação ( $y$ ) seria também diferente de zero ( $y = \text{ÁreaTCA}/\text{ÁreaPI} \neq 0 \Rightarrow \text{ÁreaTCA} \neq 0$ ), o que estaria incorreto, uma vez que a amostra não foi fortificada.

<sup>1</sup> O cromatograma da réplica 19 do ECD1 não apresentou pico de TCA para o quinto valor da curva de calibração (10 ppt), que se deverá a um erro de pipetagem, pelo que a sua curva de calibração foi desenhada sem esse ponto.

As médias dos resultados obtidos na primeira corrida cromatográfica encontram-se nas Tabela 3.5 e Tabela 3.6, tal como o coeficiente de variação e a recuperação média, para cada um dos níveis de concentração. Foram realizadas 10 réplicas de cada ponto da curva

Tabela 3.5 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD1.

	ECD1			Data: 19-12-2014		
Padrão (ppt)	0,5	1	2	5	10	20
Média	0,65	1,14	2,22	4,73	9,99	20,03
CV	13,6%	12,5%	9,4%	6,3%	4,5%	2,2%
$\bar{R}_m$	129,4%	114,0%	110,9%	94,5%	99,9%	100,2%

Tabela 3.6 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD2.

	ECD2			Data: 19-12-2014		
Padrão (ppt)	0,5	1	2	5	10	20
Média	0,52	0,85	1,49	3,48	9,42	24,77
CV	4,2%	5,6%	5,1%	4,7%	4,5%	9,4%
$\bar{R}_m$	103,3%	85,5%	74,3%	69,7%	94,2%	123,9%

No ECD1, os valores de recuperação médios encontram-se de novo dentro de um intervalo aceitável, exceto para o primeiro ponto da curva que apresenta um valor elevado.

Uma vez mais verifica-se que o coeficiente de variação tende a aumentar com a diminuição do teor de TCA na amostra, e nos dois primeiros pontos da reta o valor do coeficiente é superior a 10%.

No segundo cromatógrafo, apesar de o coeficiente de variação ser inferior a 10% para todos os pontos da curva, os valores de recuperação médios são bastantes diferentes de 100%, como já foi referido. Estas diferenças consideráveis entre o valor fortalecido na amostra e o valor lido no sistema traduzem-se numa pobre linearidade.

Esta desigualdade tão acentuada entre a concentração fortificada e a resposta do sistema poder-se-á dever à utilização de um padrão interno antigo, onde a concentração de 2,3,6-tricloroanisol fosse inferior a 20 ppt. Esta diminuição da concentração é explicada com uma possível evaporação do composto, ao longo da sua utilização. No entanto, caso a razão desta diferença fosse o facto da concentração do padrão interno ser menor que a pensada, todos os pontos apresentariam concentrações maiores que a esperada, o que apenas se verifica no último ponto da curva (Tabela 3.6).

Os maus resultados em termos de recuperação, no primeiro ponto da reta do ECD1, e em termos de coeficiente de variação nos dois primeiros pontos, aliados aos maus resultados em termos de linearidade no ECD2, bem como com aos maus resultados de recuperação em grande parte da gama de concentrações do mesmo cromatógrafo, levou a uma repetição do teste.

### 3º Teste

O terceiro teste à linearidade foi realizado a 09 de janeiro de 2015 no primeiro cromatógrafo e a 30 de janeiro de 2015 no segundo.

O teste no ECD2 foi realizado após a troca da coluna cromatográfica.

As curva de calibração, do ECD1 e ECD2, utilizadas na leitura dos valores são representadas pelas Equações 62 e 63.

$$y = 1,87047x + 8,5668 \times 10^{-3} \quad \text{Eq. 62}$$

$$y = 1,69257x - 0,00233 \quad \text{Eq. 63}$$

Com  $r^2 = 0,9997$  e  $1,0000$ , respetivamente.

Na Tabela 3.7 encontram-se as curvas para as dez réplicas das amostras padrão dos seis pontos da curva de calibração.

*Tabela 3.7 - Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e quantificação para ambos os cromatógrafos.*

#	ECD1		ECD2	
	Equação da Curva de Calibração	$r^2$	Equação da Curva de Calibração	$r^2$
01	$y = 1,5156x - 0,0049$	0,9990	$y = 1,7513x - 0,0148$	0,9991
02	$y = 1,5702x - 0,0078$	0,9988	$y = 1,7051x - 0,0077$	0,9993
03	$y = 1,5374x - 0,0005$	0,9997	$y = 1,7731x - 0,0162$	0,9992
04	$y = 1,5473x - 0,0051$	0,9995	$y = 1,7753x - 0,0129$	0,9995
05	$y = 1,5033x - 0,0007$	0,9999	$y = 1,7405x - 0,0086$	0,9998
06	$y = 1,5123x - 0,0124$	0,9989	$y = 1,7333x - 0,0088$	0,9998
07	$y = 1,5258x - 0,0073$	0,9995	$y = 1,6964x - 0,0009$	0,9999
08	$y = 1,4815x - 0,0004$	0,9993	$y = 1,6736x + 0,0010$	0,9999
09	$y = 1,5814x - 0,0133$	0,9993	$y = 1,7182x - 0,0062$	0,9998
10	$y = 1,5192x - 0,0028$	0,9991	$y = 1,7649x - 0,0055$	0,9996

Os resultados do ECD1 apresentam boas linearidades, onde nenhum dos coeficientes de correlação é igual ou inferior ao critério de aceitação.

No ECD2, os resultados do 3º teste da linearidade, no intervalo de concentrações estudado, apresentam excelente linearidade, onde todas as curvas de calibração apresentam um  $r^2 \geq 0,9995$ . As ordenadas na origem apresentam valores bastante próximos de zero, em ambos os cromatógrafos.

As médias dos resultados obtidos na primeira corrida cromatográfica encontram-se nas Tabela 3.8 e Tabela 3.9, tal como o coeficiente de variação e a recuperação média, para cada um dos níveis de concentração. Foram realizadas 10 réplicas de cada ponto da curva

Tabela 3.8 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD1.

	ECD1			Data: 02-03-2015		
Padrão (ppt)	0,5	1	2	5	10	20
Média	0,50	1,04	2,13	4,81	9,70	19,97
CV	16,2%	3,3%	3,1%	3,0%	2,9%	1,8%
$\bar{R}_m$	100,9%	103,8%	106,3%	96,1%	97,0%	99,9%

Tabela 3.9 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação para o ECD2.

	ECD2			Data: 30-02-2015		
Padrão (ppt)	0,5	1	2	5	10	20
Média	0,51	1,01	2,01	4,88	10,09	20,37
CV	4,5%	4,1%	3,2%	3,1%	2,5%	3,1%
$\bar{R}_m$	101,2%	100,5%	100,4%	97,5%	100,9%	101,9%

Tanto no ECD1 como no ECD2, os valores médios de cada um dos níveis de concentração encontram-se bastante próximos dos valores fortificados, traduzindo-se em bons resultados em termos de recuperação. O ECD2 apresenta excelentes resultados em termos de médias de cada um dos níveis fortificados, que se traduz nos excelentes resultados de recuperação média, bem como excelentes resultados em termos de coeficiente de variação, apresentando valores sempre inferiores a 5%, mesmo para os níveis mais baixos. No entanto, o mesmo não se verifica no primeiro cromatógrafo, onde o coeficiente de variação do nível de 0,50 ppt é de 16,2%. O teste foi repetido para o primeiro cromatógrafo.

#### 4º Teste – ECD1

O quarto teste à linearidade do primeiro cromatógrafo foi realizado a 02 de Março de 2015

A curva de calibração utilizada na leitura dos valores é representada pela Equação 64.

$$y = 1,37136x - 0,00130 \quad \text{Eq. 64}$$

Com  $r^2 = 0,9996$ .

Na Tabela 3.10 encontram-se as curvas para as dez réplicas das amostras padrão dos seis pontos da curva de calibração.

Tabela 3.10 - Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e quantificação para o ECD1.

#	ECD1	
	Equação da Curva de Calibração	$r^2$
01	$y = 2,0415x - 0,0570$	0,9958
02	$y = 1,8323x - 0,0248$	0,9980
03	$y = 1,9686x - 0,0438$	0,9968
04	$y = 1,8534x - 0,0168$	0,9987
05	$y = 1,9142x - 0,0275$	0,9979
06	$y = 1,8950x - 0,0194$	0,9987
07	$y = 2,0968x - 0,0590$	0,9931
08	$y = 2,1346x - 0,0694$	0,9887
09	$y = 2,0188x - 0,0552$	0,9934
10	$y = 2,0312x - 0,0559$	0,9890

Os resultados do ECD1 apresentam linearidades baixas, sendo que nenhuma ultrapassa o coeficiente de correlação  $r^2 = 0,9990$ . Esta pobre linearidade prende-se com o facto de os resultados cromatográficos terem sido bastante inferiores aos valores de fortificação, o que pode ser observado nos valores de médios de cada nível, representados na Tabela 3.11. Além da baixa linearidade, as retas apresentam novamente os valores da ordenada na origem um pouco elevados, em módulo.

As médias dos resultados obtidos na primeira corrida cromatográfica encontram-se na Tabela 3.11, tal como o coeficiente de variação e a recuperação média, para cada um dos níveis de concentração. Foram realizadas 10 réplicas de cada ponto da curva

Tabela 3.11 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação.

Padrão (ppt)	ECD1			Data: 02-03-2015		
	0,5	1	2	5	10	20
Média	0,33	0,62	1,55	3,49	8,15	18,06
CV	15,0%	23,6%	5,7%	5,8%	3,5%	5,6%
$\bar{R}_m$	66,4%	62,4%	77,3%	69,8%	81,5%	90,3%

Os valores médios de cada um dos níveis de concentração encontram-se todos bastante abaixo do valor teoricamente fortificado. Tal dever-se-á ao facto de as amostras terem sido corridas no cromatógrafo dois dias depois de terem sido preparadas. Durante o tempo de espera entre o fim da preparação das amostras e a sua corrida, o TCA terá evaporado, levando a que a solução apresentasse uma concentração de TCA inferior à esperada. Aliado a este facto, outra razão que poderá explicar os resultados abaixo do esperado, prende-se com a utilização de padrões de TCA antigos, que poderiam, também eles, ter perdido parte do TCA por evaporação, baixando a sua concentração.

Os valores baixos das médias de cada ponto traduzem-se em valores baixos na recuperação média dos mesmos.

Os maus resultados apresentados, tanto em termos de recuperação como em termos de coeficiente de variação, aliados à sua baixa linearidade, levam a que o teste neste cromatógrafo tenha sido novamente repetido.

### 5º Teste – ECD1

O quinto teste à linearidade do primeiro cromatógrafo foi realizado a 07 de março de 2015. O teste foi realizado com novos padrões provenientes do I&D, chegados ao laboratório a 06 de março.

A curva de calibração utilizada na leitura dos valores é representada pela Equação 65.

$$y = 1,48602x - 0,02280 \quad \text{Eq. 65}$$

Com  $r^2 = 0,9987$ .

Na Tabela 3.12 encontram-se as curvas para as dez réplicas das amostras padrão dos seis pontos da curva de calibração.

*Tabela 3.12 - Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e quantificação para o ECD1.*

#	ECD1	
	Equação da Curva de Calibração	$r^2$
<b>01</b>	$y = 1,4486x - 0,0155$	0,9998
<b>02</b>	$y = 1,4429x - 0,0171$	0,9997
<b>03</b>	$y = 1,1933x - 0,0238$	0,9997
<b>04</b>	$y = 1,4773x - 0,0191$	0,9999
<b>05</b>	$y = 1,4605x - 0,0275$	0,9969
<b>06</b>	$y = 1,5282x - 0,0358$	0,9995
<b>07</b>	$y = 1,4591x - 0,0118$	0,9993
<b>08</b>	$y = 1,4998x - 0,0175$	0,9991
<b>09</b>	$y = 1,4531x - 0,0159$	0,9997
<b>10</b>	$y = 1,4891x - 0,0208$	0,9998

Os resultados do ECD1 apresentam excelente linearidade, sendo que apenas uma curva apresenta um coeficiente de correlação  $r^2 < 0,9990$ . Os valores da ordenada na origem encontram-se bastante próximos de zero.

As médias dos resultados obtidos na primeira corrida cromatográfica encontram-se na Tabela 3.13, tal como o coeficiente de variação e a recuperação média, para cada um dos níveis de concentração. Foram realizadas 10 réplicas de cada ponto da curva

Tabela 3.13 - Valores médios de TCA e respetivo coeficiente de variação e taxa de recuperação.

	ECD1			Data: 07-03-2015		
Padrão (ppt)	0,5	1	2	5	10	20
Média	0,55	1,01	2,00	4,93	10,23	19,80
CV	6,1%	6,7%	5,1%	2,7%	2,5%	1,9%
$\bar{R}_m$	110,2%	100,8%	99,9%	98,6%	102,3%	99,0%

Os valores médios encontram-se bastante próximos dos valores de fortificação, pelo que os valores de recuperação média se apresentam bastante próximos do 100%.

Os coeficientes de variação, para cada nível de fortificação, encontram-se abaixo do critério de aceitação de 10%.

Apesar a linearidade ter sido validada, foram necessários cinco testes para o ECD1 e três testes para o ECD2. No entanto, segundo (Wood, 1999), para concentrações na ordem dos ppb -  $10^{-9}$  g/l – mil vezes superior às concentrações utilizadas nos testes, o coeficiente de variação permitido é de 45%. Mesmo tendo em conta o ano da publicação citada, e os possíveis avanços tecnológicos que a cromatografia gasosa sofreu, o critério de aceitação pré-estabelecido de 10% poderá ser demasiado baixo, principalmente para o primeiro ponto da curva de calibração. Caso o coeficiente de variação mínimo pré-estabelecido tivesse sido de 20%, a linearidade teria sido validada no terceiro teste, em ambos os cromatógrafos.

De forma a tentar compreender o porquê de o teste, com os critérios de aceitação pré-estabelecidos, só ter sido validado no quinto e terceiro teste, para o ECD1 e ECD2, respetivamente, foram estudadas as alterações sofridas pelo método tanto em termos da mudança dos padrões, como a alteração ou corte da coluna (Tabela 3.14).

Observando as condições sob as quais cada teste foi realizado, é de crer que a mudança de padrões aliado ao corte de coluna do ECD1, prévios ao 5º teste de linearidade terão permitido obter melhores resultados e então validar a linearidade neste cromatógrafo. Em relação ao ECD2, a mudança para uma nova coluna terá sido o principal fator que permitiu obter melhores resultados neste cromatógrafo.



Tabela 3.14 - Alteração de parâmetros como o nova coluna, corte de coluna ou recalibração entre testes.

Data	ECD1	ECD2
03/12/2014	-	- Corte de coluna - Calibração
05/12/2014	<b>1º Teste de linearidade</b>	
19/12/2014	<b>2º Teste de linearidade</b>	
05/01/2015	- Corte de coluna - Calibração	- Corte de coluna - Calibração
09/01/2015	- Mudança de fibra <b>3º Teste de linearidade</b>	- Mudança de fibra
26/01/2015	- Corte de coluna - Calibração	- Mudança de coluna e fibra - Calibração
28/01/2015	-Calibração	-
30/01/2015	-	<b>3º Teste de linearidade</b>
25/02/2015	- Calibração	-
02/03/2015	- Mudança de fibra <b>4º Teste de linearidade</b>	-
06/03/2015	Novos padrões provenientes do I&D	
06/03/2015	- Corte de coluna - Calibração	-
07/03/2015	<b>5º Teste de linearidade</b>	-

Na Tabela 3.15 encontram-se os parâmetros da curva de calibração, de cada cromatógrafo, sob a qual cada teste foi corrido.

Tabela 3.15 - Curvas de calibração para cada teste realizado.

Teste	ECD1			ECD2		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
1º	1,70322	0,03764	0,9980	1,60752	-0,01317	0,9993
2º	1,87047	$8,5668 \times 10^{-3}$	0,9997	2,05591	-0,04572	0,9998
3º	1,87047	$8,5668 \times 10^{-3}$	0,9997	1,69257	-0,00233	1,0000
4º	1,37136	-0,00130	0,9996	-	-	-
5º	1,48602	-0,02280	0,9987	-	-	-

### 3.3. Limiares Analíticos

Como é enunciado no subcapítulo 1.7.5 Limiares Analíticos, estes limiares são usualmente calculados/determinados de três distintas formas.

### 3.3.1. Através do Desvio Padrão Residual da Curva de Calibração

Quando o método envolve a elaboração de uma curva de calibração, os limiares podem ser calculados com recurso às equações 23 e 25 (subcapítulo 1.7.5 Limiares Analíticos).

Foram calculados os limites de deteção e de quantificação apenas para as curvas cujo coeficiente de correlação era superior ao limite imposto como critério de aceitação, correspondente a 0,9950.

#### 1º Teste

*Tabela 3.16 - Valores do coeficiente de correlação de cada curva de calibração, desvio padrão residual da respetiva reta e limites de deteção e de quantificação, para cada ECD.*

ECD1					ECD2				
#	$r^2$	$S_{y/x}$	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)	#	$r^2$	$S_{y/x}$	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
02	0,9981	0,0340	1,22	3,69	02	0,9990	0,0226	0,88	2,68
03	0,9987	0,0279	1,02	3,08	03	0,9992	0,0209	0,79	2,39
04	0,9980	0,0320	1,23	3,74	04	0,9975	0,0372	1,40	4,25
05	0,9977	0,0367	1,34	4,08	05	0,9999	0,0078	0,31	0,93
06	0,9999	0,0083	0,30	0,91	06	0,9998	0,0094	0,37	1,13
07	0,9998	0,0109	0,41	1,26	07	0,9966	0,0434	1,62	4,90
08	0,9998	0,0117	0,43	1,30	08	0,9992	0,0213	0,80	2,41
09	0,9985	0,0289	1,07	3,25	09	0,9983	0,0315	1,15	3,49
10	0,9986	0,0279	1,04	3,15	10	0,9964	0,0426	1,66	5,04
11	1,0000	0,0044	0,16	0,48	11	0,9996	0,0142	0,54	1,63
12	0,9980	0,0350	1,24	3,77	12	0,9989	0,0235	0,92	2,79
13	0,9993	0,0190	0,72	2,17	13	0,9966	0,0410	1,62	4,90
14	0,9987	0,0285	0,99	3,00	14	0,9991	0,0219	0,84	2,54
15	0,9989	0,0773	2,43	7,35	15	0,9999	0,0072	0,28	0,86
16	0,9996	0,0150	0,54	1,63	16	0,9964	0,0438	1,67	5,06
17	0,9969	0,0435	1,56	4,72	17	0,9994	0,0178	0,71	2,14
18	0,9979	0,0380	1,26	3,83	18	0,9983	0,0298	1,16	3,50
20	0,9977	0,0385	1,34	4,07	19	0,9991	0,0222	0,82	2,49
Média			1,02	3,08	20	0,9977	0,0180	0,68	2,07
Máximo			2,43	7,35	Média			0,96	2,91
Mínimo			0,16	0,48	Máximo			1,67	5,06
					Mínimo			0,28	0,86

Verifica-se que existem algumas variações dos limiares analíticos, de curva para curva, no mesmo cromatógrafo. É possível também observar-se uma relação entre o coeficiente de correlação da curva de calibração e os valores dos limites. Quanto mais próximo de 1 é o coeficiente de correlação, menor é o desvio padrão residual da curva e, consequentemente, menores são os limites de deteção e quantificação.

Tanto os valores de deteção como de quantificação apresentam resultados geralmente muito superiores aos esperados (seria esperado um valor igual ou inferior a 0,5

ppt para o limite de quantificação, uma vez que este nível já apresentou, em resultados anteriores, um coeficiente de variação inferior a 10%).

Como é possível ver na Tabela 3.16, para o ECD1 o par dos limites de detecção e quantificação com valores mais elevados foi de 2,43 e 7,45 ppt (da curva que apresenta um  $r^2 = 0,9989$  – menor coeficiente de correlação das  $n = 18$  réplicas com  $r^2 \geq 0,9950$ ), respetivamente, e o menor par foi de 0,16 e 0,48 ppt (da curva que apresenta um  $r^2 = 1,0000$  – maior coeficiente de correlação). Os valores médios para a detecção e quantificação foram, respetivamente, 1,02 e 3,08 ppt. Estes valores são bastante superiores aos teoricamente esperados.

No ECD2 verificou-se a mesma relação entre os valores dos limiares e do coeficiente de correlação. Os valores mais elevados dos limiares analíticos foram de 1,67 e 5,06 ppt ( $r^2 = 0,9964$ ) e de 0,28 e 0,86 ppt ( $r^2 = 0,9999$ ). Os valores médios destes valores, 0,96 e 2,91, são também eles, bastante superiores aos valores teoricamente esperados.

## 2º Teste

Uma vez que, no ECD2, para o segundo teste, nenhuma das curvas apresentou um coeficiente de correlação superior ao critério de aceitação, este cromatógrafo foi ignorado no cálculo dos limiares analíticos.

*Tabela 3.17 - Valores do coeficiente de correlação de cada curva de calibração, desvio padrão residual da respetiva reta e limites de detecção e de quantificação, para o ECD1.*

#	ECD1			
	$r^2$	$S_{y/x}$	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
01	0,9957	0,0502	1,83	5,53
02	0,9993	0,0455	1,51	4,57
03	0,9997	0,0126	0,46	1,40
04	0,9996	0,0154	0,54	1,65
05	0,9989	0,0265	0,93	2,81
06	0,9977	0,0393	1,35	4,09
07	0,9994	0,0183	0,66	1,99
08	0,9956	0,0544	1,84	5,58
09	0,9986	0,0291	1,05	3,18
10	0,9990	0,0234	0,86	2,60
11	0,9996	0,0156	0,56	1,68
12	0,9998	0,0112	0,39	1,18
13	0,9969	0,0436	1,55	4,70
14	0,9992	0,0223	0,80	2,42
15	0,9981	0,0357	1,22	3,71
16	0,9988	0,0266	0,96	2,92
17	0,9987	0,0288	1,01	3,05
18	0,9966	0,0455	1,63	4,95
19	0,9990	0,0116	3,55	10,75
20	0,9989	0,0264	0,94	2,84
<b>Média</b>			1,18	3,58
<b>Máximo</b>			3,55	10,75
<b>Mínimo</b>			0,39	1,18

Verificam-se diferenças significativas nos limites, de curva para curva, e observa-se a mesma relação entre o coeficiente de correlação da reta e os valores dos limiares analíticos. As médias dos limites são bastante idênticas às obtidas no mesmo cromatógrafo, no primeiro teste, mantendo-se bastante elevados.

No ECD2, nenhuma das retas obtidas apresenta um coeficiente de correlação igual ou superior ao critério de aceitação, como já foi enunciado, traduzindo-se em valores de detecção e quantificação bastante elevados e com uma grande dispersão. Esta baixa linearidade é explicada com os valores de recuperação do teste, representados na Tabela 3.6, onde se observa que as recuperações médias de três dos seis pontos da reta encontram-se fora de um intervalo considerado aceitável (80-120%).

### 3º Teste

O cálculo dos limiares analíticos do terceiro teste será feito apenas para o ECD2 uma vez que foi o único a apresentar bons resultados de linearidade.

*Tabela 3.18 - Valores do coeficiente de correlação de cada curva de calibração, desvio padrão residual da respectiva reta e limites de detecção e de quantificação, para o ECD2.*

#	ECD2			
	$r^2$	$S_{y/x}$	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
<b>01</b>	0,9991	0,0226	0,85	2,59
<b>02</b>	0,9993	0,0189	0,73	2,22
<b>03</b>	0,9992	0,0209	0,78	2,35
<b>04</b>	0,9995	0,0162	0,60	1,82
<b>05</b>	0,9998	0,0110	0,42	1,26
<b>06</b>	0,9998	0,0097	0,37	1,12
<b>07</b>	0,9999	0,0132	0,51	1,56
<b>08</b>	0,9999	0,0057	0,22	0,68
<b>09</b>	0,9998	0,0093	0,36	1,09
<b>10</b>	0,9996	0,0150	0,56	1,70
<b>Média</b>			0,54	1,64
<b>Máximo</b>			0,85	2,59
<b>Mínimo</b>			0,22	0,68

No terceiro teste, onde os coeficientes de correlação se apresentaram mais altos que os restantes testes, o resultado médio dos limiares analíticos apresentou-se mais baixo, com média de 0,54 e 1,64 ppt, para o LOD e LOQ, respetivamente.

## 5º Teste – ECD1

Tabela 3.19 - Valores do coeficiente de correlação de cada curva de calibração, desvio padrão residual da respetiva reta e limites de deteção e de quantificação, para o ECD1.

#	ECD1			
	$r^2$	$S_{y/x}$	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
01	0,9998	0,0084	0,38	1,16
02	0,9997	0,0112	0,51	1,55
03	0,9997	0,0100	0,44	1,34
04	0,9999	0,0056	0,25	0,76
05	0,9969	0,0345	1,56	4,73
06	0,9995	0,0149	0,64	1,95
07	0,9993	0,0167	0,76	2,30
08	0,9991	0,0195	0,86	2,59
09	0,9997	0,0103	0,47	1,41
10	0,9998	0,0090	0,40	1,21
<b>Média</b>			0,63	1,90
<b>Máximo</b>			1,56	4,73
<b>Mínimo</b>			0,25	0,76

Apesar de os limiares apresentarem valores mais baixos, para curvas com coeficientes de correlação mais elevados, estes mantêm-se superiores aos teoricamente esperados.

Os resultados dos limiares analíticos, calculados através do desvio padrão residual da curva de calibração, apresentaram-se, para todos os testes realizados, bastante superiores aos limiares esperados. Pode-se considerar que este não será o método apropriado para o cálculo dos limiares analíticos uma vez que, como já foi referido, o limite de quantificação do método terá de apresentar um coeficiente de variação (CV), para  $n \geq 10$  réplicas, um valor inferior a 10%. Uma vez que, em ambos os cromatógrafos, os resultados obtidos para a concentração mais baixa da curva (0,5 ppt) apresentaram um CV inferior a 10%, os valores médios do limite de quantificação, para o ECD1 e ECD2, no 5º e 3º teste respetivamente, de 1,90 e 1,64 ppt, são consideravelmente superiores a 0,5 ppt. Assim sendo, pode-se assumir que este método de cálculo dos limiares analíticos não será o mais apropriado para o método.

### 3.3.2. Através do Desvio Padrão da Amostra

Segundo o guia (Relacre, 2000), os limites de deteção e quantificação podem, também, ser calculados a partir da média aritmética e desvio padrão de amostras brancas ou fortificadas com concentrações vestigiais.

Desta forma, foram realizados testes com amostras fortificadas com concentrações de 0,2 ppt. Os resultados encontram-se na Tabela 3.20.

Os limiares analíticos, segundo o guia (Relacre, 2000), são calculados através das equações 24 e 26, respetivamente, presentes no subcapítulo 1.7.5 Limiares Analíticos.

Tabela 3.20 - Resultados das amostras fortificadas com concentrações vestigiais, e limiares analíticos.

	Média	S	CV	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
ECD1	0,23	0,03	3,6%	0,34	0,55
ECD2	0,23	0,02	9,0%	0,29	0,43

Os resultados obtidos são bastante idênticos entre os cromatógrafos, e o limite de quantificação apresenta valores bastante próximos de 0,5 ppt, que corresponde ao valor mínimo da curva de calibração que terá de ser igual ou superior ao limite de quantificação, pelas razões já referidas.

### 3.3.3. Através da Razão Sinal:Ruído (S/N)

Como é possível ver pelas figuras Figura 3.4 e Figura 3.5, em nenhum dos cromatógrafos apresenta ruído de linha de base para o cálculo dos limiares analíticos através deste método.

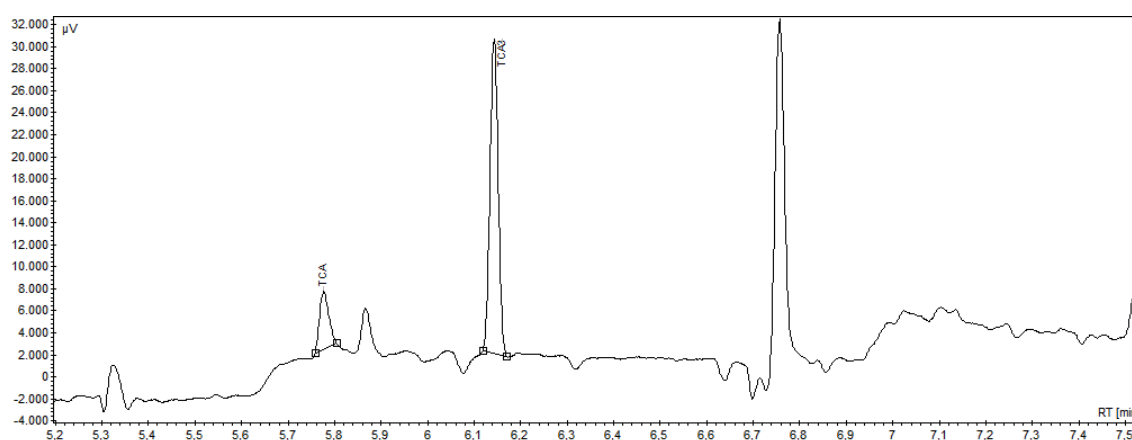


Figura 3.4 - Cromatograma do ECD1, com padrão de 2 ppt.

### 3.3.4. Comparação

Analisando os resultados obtidos, representados na Tabela 3.21 pelos métodos de cálculo dos limiares seguidos, verifica-se uma considerável diferença entre eles. No cálculo efetuado com dez replicados de um branco fortificado, os limites de deteção possuem valores teoricamente expectáveis, tendo principalmente em conta o resultado perto de 0,5 ppt para o limite de quantificação, para ambos os cromatógrafos. No cálculo dos limiares

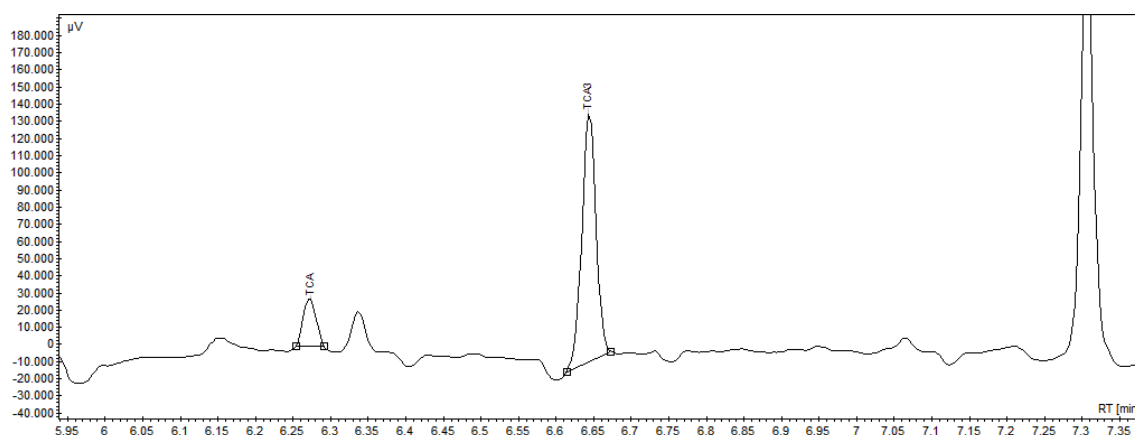


Figura 3.5 - Cromatograma do ECD2, com padrão de 2 ppt.

analíticos através do desvio padrão residual da curva de calibração, os valores são consideravelmente superiores aos calculados pelo método do desvio padrão da amostra. Seria favorável obter um valor de limite de quantificação o mais próximo possível do limite de deteção, o que não acontece neste método de cálculo onde os limiares apresentam valores distantes. Uma possível justificação para estes resultados deve-se ao facto de o cálculo recorrendo à curva de calibração introduzir mais erros, visto tratar-se de uma manipulação experimental, à qual se sucedem várias manipulações matemáticas que vão introduzindo erros sucessivos nos resultados. O guia (IPAC, 2007) apresenta também justificações para o aparecimento de valores irrealistas para os limiares analíticos, quando determinados através do método dos mínimos quadrados. Estas justificações são a possibilidade de não existência de homogeneidade de variâncias, falha da linearidade até à origem ou exclusão do branco da curva de calibração. Assim, os valores dos limiares calculados através do desvio padrão da amostra serão mais fiáveis.

Tabela 3.21 - Resultados dos limiares analíticos, calculados através do método do desvio padrão residual da curva de calibração e através do método do desvio padrão da amostra, para ambos os cromatógrafos.

	Método de cálculo pelo desvio padrão residual		Método de cálculo pelo desvio padrão da amostra	
	ECD1	ECD2	ECD1	ECD2
<b>Limite de Deteção (ppt)</b>	0,63	0,54	0,34	0,29
<b>Limite de Quantificação (ppt)</b>	1,90	1,64	0,55	0,43

### 3.4. Precisão

A avaliação da precisão tem como objetivo averiguar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, executados sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, em condições definidas, consoante o teste:

- **Repetibilidade** – exprime a precisão do método, em que as condições sob as quais o ensaio é realizado são tão estáveis quanto possíveis – mesmo

laboratório, mesmo equipamento, mesmo analista, mesmos reagentes, e em curtos espaços de tempo;

- **Reprodutibilidade** – refere-se à precisão do método onde os ensaios são realizados sob diferentes condições – diferente laboratório, diferente analista, diferente equipamento e/ou diferentes tempos;
- **Precisão Intermédia** – é um processo de avaliação da precisão do método, entre a repetibilidade e a reprodutibilidade, onde são definidas exatamente quais as condições a variar, uma ou mais, como por exemplo diferentes analistas, diferentes equipamentos e/ou diferentes épocas.

### 3.4.1. Repetibilidade

Na avaliação da precisão do método através da repetibilidade foram, para os seis níveis de concentrações da curva de calibração, avaliados dez replicados num curto intervalo de tempo.

Nas Tabela 3.22 e Tabela 3.23 encontram-se representados os resultados obtidos nos ensaios de precisão sob condições de repetibilidade, bem como os valores de limite de repetibilidade e coeficiente de variação, calculado para cada nível de concentração.

O teste da repetibilidade do ECD1 foram realizados com os resultados do 5º teste de linearidade, e o teste da repetibilidade do EDC2 foram realizados com os resultados do 3º teste de linearidade.

*Tabela 3.22 - Valores de concentração de TCA obtidos nos ensaios de repetibilidade, valor de limite de repetibilidade e coeficiente de variação, para cada nível de concentração.*

ECD1												
#	0,5 ppt		1 ppt		2 ppt		5 ppt		10 ppt		20 ppt	
	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$
01	0,54	-	0,97	-	2,10	-	4,98	-	10,02	-	19,51	-
02	0,52	0,02	0,99	0,02	2,06	0,04	4,84	0,14	10,04	0,02	19,39	0,12
03	0,51	0,01	0,97	0,02	1,92	0,14	4,70	0,14	9,97	0,07	19,99	0,60
04	0,51	0,00	1,10	0,13	2,06	0,14	4,92	0,22	10,08	0,11	19,91	0,08
05	0,55	0,04	0,93	0,17	1,80	0,26	5,15	0,23	10,71	0,63	19,39	0,52
06	0,56	0,01	0,92	0,01	1,88	0,08	4,95	0,20	10,27	0,44	19,55	0,16
07	0,60	0,04	1,06	0,14	1,97	0,09	5,12	0,17	10,34	0,07	19,60	0,05
08	0,59	0,01	1,09	0,03	2,05	0,08	4,86	0,26	10,59	0,25	20,11	0,51
09	0,59	0,00	0,97	0,12	2,05	0,00	4,94	0,08	10,10	0,49	20,52	0,41
10	0,54	0,05	1,08	0,11	2,09	0,04	4,83	0,11	10,14	0,04	20,07	0,45
$S_r$	0,03		0,07		0,10		0,13		0,25		0,37	
$CV$	6,1%		6,7%		5,1%		2,7%		2,5%		1,9%	
$r_r$	0,11		0,22		0,32		0,43		0,80		1,20	



Tabela 3.23 - Valores de concentração de TCA obtidos nos ensaios de repetibilidade, valor de limite de repetibilidade e coeficiente de variação, para cada nível de concentração.

ECD2												
#	0,5 ppt		1 ppt		2 ppt		5 ppt		10 ppt		20 ppt	
	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$	[TCA]	$X_i - X_{i-1}$
01	0,52	-	0,98	-	2,01		4,89	-	9,78	-	20,77	-
02	0,49	0,03	1,06	0,08	2,06	0,05	4,57	0,32	10,09	0,31	20,13	0,64
03	0,49	0,00	1,05	0,01	2,02	0,04	4,75	0,18	10,69	0,60	20,96	0,83
04	0,51	0,02	1,00	0,05	2,12	0,10	4,91	0,16	10,13	0,56	21,00	0,04
05	0,50	0,01	1,01	0,01	1,99	0,13	4,84	0,07	10,31	0,18	20,49	0,51
06	0,49	0,01	1,01	0,00	1,99	0,00	4,99	0,15	9,98	0,33	20,50	0,01
07	0,52	0,03	0,94	0,07	1,93	0,06	4,76	0,23	9,97	0,01	19,99	0,51
08	0,55	0,03	0,94	0,00	2,07	0,14	4,96	0,20	9,92	0,05	18,82	1,17
09	0,52	0,03	1,02	0,08	1,92	0,15	5,04	0,08	9,94	0,02	20,34	1,52
10	0,47	0,05	1,04	0,02	1,96	0,04	5,06	0,02	10,08	0,14	20,70	0,36
$S_r$	0,02		0,04		0,06		0,15		0,25		0,64	
$CV$	4,5%		4,2%		3,2%		3,1%		2,5%		3,1%	
$r_r$	0,07		0,13		0,20		0,48		0,82		2,04	

Segundo (Relacre, 2000), um método apresenta boa repetibilidade quando a diferença absoluta entre dois ensaios consecutivos não ultrapassa o limite de repetibilidade.

Do desvio padrão ( $S_r$ ) dos resultados dos ensaios realizados em condições de repetibilidade, calcula-se o limite de repetibilidade ( $r_r$ ), para cada concentração, a partir da Equação 29 presente no subcapítulo 1.7.6. Precisão.

Em ambos os cromatógrafos é possível observar-se que esta diferença ( $X_i - X_{i-1}$ ) não ultrapassa o limite de repetibilidade, com nível de confiança de 97,5%, calculado para cada concentração.

Uma outra forma de avaliar a precisão baseada em dados de repetibilidade é através do coeficiente de variação (CV), calculado a partir da Equação 30, presente no subcapítulo 1.7.6. Precisão. Verifica-se que, para cada um dos diferentes níveis de concentração estudados, em cada cromatógrafo, o coeficiente de variação é sempre inferior a 10%.

Tendo em conta os resultados obtidos, pode-se afirmar que o método apresenta bons resultados em termos de precisão, quando os ensaios são realizados sob condições de repetibilidade.

### 3.4.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do método é estudada através de ensaios interlaboratoriais promovidos pelo I&D, nos quais, entre outros, participa o laboratório de qualidade da UI Equipar. Neste ensaio é calculado o valor de  $z$  – *score* para cada laboratório. Segundo a norma do teste – ISO 5725-2 – este resultado permite uma avaliação da reprodutibilidade do laboratório, baseando-se no valor de  $z$  – *score* obtido.

Nos ensaios laboratoriais, o departamento de investigação e desenvolvimento da Amorim & Irmãos envia, para cada laboratório, duas amostras – A e B – de diferentes concentrações. Após cada laboratório obter os seus resultados cromatográficos, estes são enviados para o departamento I&D, que faz um tratamento dos resultados, incluindo o cálculo do  $z - score$ , e envia um relatório com os dados tratados para cada laboratório participante.

Uma vez que o laboratório da UI Equipar possui dois cromatógrafos, as amostras A e B são corridas em ambos.

Foram então considerados, para a validação da precisão em condições de reprodutibilidade, os resultados dos últimos cinco ensaios interlaboratoriais realizados.

Os resultados encontram-se na Tabela 3.24.

*Tabela 3.24 - Resultados dos ensaios interlaboratoriais e respetivo z-score, para ambos os cromatógrafos.*

Amostra	Teste	Data	ECD1				ECD2			
			$x_i$	$X_m$	$S$	$z - score$	$x_i$	$X_m$	$S$	$z - score$
A	99	17-04-2014	2,78	2,20	0,40	<b>1,46</b>	2,57	2,20	0,40	<b>0,93</b>
	100	19-05-2014	9,20	8,40	1,90	<b>0,42</b>	9,35	8,40	1,90	<b>0,50</b>
	103	11-09-2014	1,64	1,20	0,50	<b>0,87</b>	1,61	1,20	0,50	<b>0,82</b>
	105	21-11-2014	0,69	0,50	0,10	<b>1,90</b>	0,33	0,50	0,10	<b>1,70</b>
	107	16-01-2015	1,64	1,50	0,40	<b>0,36</b>	1,38	1,50	0,40	<b>0,31</b>
B	99	17-04-2014	0,99	0,90	0,40	<b>0,22</b>	1,10	0,90	0,40	<b>0,49</b>
	100	19-05-2014	9,35	8,40	1,90	<b>0,50</b>	4,52	4,00	1,20	<b>0,43</b>
	103	11-09-2014	0,75	0,70	0,30	<b>0,18</b>	0,58	0,70	0,30	<b>0,41</b>
	105	21-11-2014	1,14	0,80	0,40	<b>0,84</b>	0,73	0,80	0,40	<b>0,18</b>
	107	16-01-2015	0,45	0,50	0,00	<b>0,00</b>	-	-	-	-

Onde,

$x_i$  – valor obtido pelo cromatógrafo;

$X_m$  – média dos valores obtidos dos laboratórios participantes no ensaio;

$S$  – desvio padrão dos resultados obtidos pelos laboratórios participantes no ensaio.

O critério de aceitação é de  $z - score \leq 2$ , que corresponde a um resultado satisfatório.

Os resultados obtidos nos cinco testes são bastante positivos, apresentando um valor de  $z - score$  sempre inferior a 2, sendo que apenas no teste 105, a 21 de novembro de 2014, para a amostra A, o valor se aproxima de 2, apresentando um  $z - score = 1,90$  e 1,70, para o cromatógrafo 1 e 2, respetivamente.

Na Figura 3.6 - Valores de z-score obtidos pelos doze laboratórios, da amostra A do ensaio interlaboratorial 107, realizado a 16 de janeiro de 2015. estão representados os z – score da amostra A, dos doze laboratórios participantes no ensaio interlaboratorial 107,

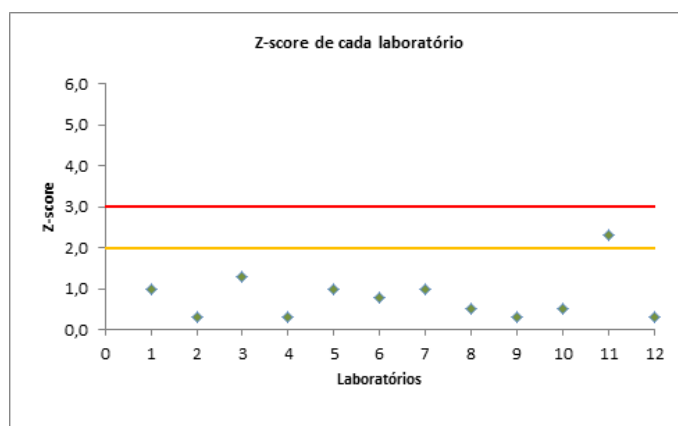


Figura 3.6 - Valores de z-score obtidos pelos doze laboratórios, da amostra A do ensaio interlaboratorial 107, realizado a 16 de janeiro de 2015.

realizado a 16 de janeiro de 2015. Os valores do ECD1 e ECD2 correspondem aos laboratórios 8 e 9, respetivamente.

### 3.4.3. Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi estudada a partir de duas amostras com gamas de TCA diferentes, as amostras A e B, preparadas a partir de macerações com valores próximos de 2 e 10 ppt, respetivamente. A partir de cada amostra, cinco diferentes operadores prepararam três réplicas por cromatógrafo.

Na Tabela 3.25 estão representados os valores obtidos no teste da precisão intermédia, bem como os valores do desvio padrão ( $S_{pi}$ ) e de limite de precisão intermédia ( $r_{pi}$ ).

Verifica-se que o método de análise de TCA apresenta bons resultados em termos de precisão intermédia, para as duas amostras, com uma confiança de 97,5%. As diferenças absolutas entre dois resultados de ensaio ( $X_i, X_{i-1}$ ) realizados em condições de precisão intermédia (referidas no subcapítulo 1.7.6.3 Precisão Intermédia) são sempre inferiores ao limite de precisão intermédia ( $r_{pi}$ ) correspondente – calculado para cada amostra, para cada cromatógrafo.

Tabela 3.25 - Resultados dos testes de precisão obtidos sob condições de precisão intermédia, desvios padrão ( $S_{pi}$ ) e limites de precisão intermédia ( $r_{pi}$ ).

#	ECD 1				ECD 2			
	Amostra A		Amostra B		Amostra A		Amostra B	
	[TCA]	$X_i, X_{i-1}$	[TCA]	$X_i, X_{i-1}$	[TCA]	$X_i, X_{i-1}$	[TCA]	$X_i, X_{i-1}$
1	2,52	-	10,55	-	1,98	-	8,93	-
	2,57	0,05	10,03	0,52	1,98	0,00	9,36	1,54
	2,58	0,01	9,24	0,79	1,99	0,01	10,9	0,86
2	3,11	0,53	9,52	0,28	2,19	0,20	10,04	0,86
	2,81	0,30	9,63	0,11	2,09	0,10	9,26	0,78
	2,73	0,08	9,37	0,26	1,99	0,10	9,56	0,30
3	2,86	0,13	8,57	0,80	1,89	0,10	9,76	0,20
	2,59	0,27	8,81	0,24	1,94	0,05	9,13	0,63
	2,82	0,23	8,47	0,34	1,93	0,01	9,65	0,52
4	2,52	0,30	9,63	1,16	2,01	0,08	9,40	0,25
	2,96	0,44	9,44	0,19	1,95	0,06	8,68	0,72
	2,45	0,51	9,84	0,40	1,96	0,01	9,82	1,14
5	3,48	1,03	9,60	0,24	1,98	0,02	9,6	0,22
	2,60	0,88	9,59	0,01	1,95	0,03	9,24	0,36
	3,64	1,04	10,17	0,58	1,93	0,02	9,29	0,05
$S_{pi}$	0,35		0,57		0,07		0,52	
$r_{pi}$	1,13		1,81		0,23		1,66	

### 3.5. Exatidão

O estudo da exatidão de um método visa avaliar a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro, e implica uma combinação de erros aleatórios e sistemáticos.

A exatidão foi realizada através da fortificação de amostras brancas com as concentrações correspondentes aos níveis da curva de calibração dos cromatógrafos.

O critério de aceitação das taxas de recuperação, para este método, foram definidos internamente como sendo uma variação de 20% em relação à recuperação ideal – 100%.

Os resultados dos ensaios de recuperação encontram-se resumidos nas Tabela 3.26 - Resultados dos ensaios de recuperação para o ECD1 (valores do 5º teste de linearidade). eTabela 3.27 - Resultados dos ensaios de recuperação para o ECD2 (valores do 3º teste de linearidade)..

Para se avaliar a presença de erros sistemáticos, o valor  $t_{calc}$  calculado através da Equação 35, no subcapítulo 1.7.7 Exatidão, é comparado com o valor de  $t$  – student tabelado,  $t_{tab} = 2,2622$ , correspondente a um nível de confiança de 97,5% e a  $n - 1 = 9$  graus de liberdade. Verifica-se que os valores de  $t_{calc}$  são todos inferiores a 2,2622, exceto para o nível de 0,50 ppt no ECD1, sendo que para esta concentração, neste ensaio, ficou

provada a existência de erros sistemáticos. A este nível de concentrações é compreensível uma vez que, uma pequena variação no valor médio da concentração de TCA em relação à concentração fortificada, traduz-se numa variação percentual considerável em termos de recuperação, o que leva a um  $t_{calc}$  elevado. Caso a recuperação média do ensaio fosse apenas menos 0,03 ppt, o  $t_{calc}$  deste já seria igual a 1,89 e ficaria provada a inexistência de erros sistemáticos.

Para as restantes concentrações ficou provado, para um nível de confiança de 97,5%, a inexistência de erros sistemáticos.

Tabela 3.26 - Resultados dos ensaios de recuperação para o ECD1 (valores do 5º teste de linearidade).

ECD1												
#	0,5 ppt		1 ppt		2 ppt		5 ppt		10 ppt		20 ppt	
	[TCA]	R	[TCA]	R	[TCA]	R	[TCA]	R	[TCA]	R	[TCA]	R
	0,54	108,0%	0,97	97,0%	2,10	105,0%	4,98	99,6%	10,02	100,2%	19,51	97,6%
	0,52	104,0%	0,99	99,0%	2,06	103,0%	4,84	96,8%	10,04	100,4%	19,39	97,0%
	0,51	102,0%	0,97	97,0%	1,92	96,0%	4,70	94,0%	9,97	99,7%	19,99	100,0%
	0,51	102,0%	1,10	110,0%	2,06	103,0%	4,92	98,4%	10,08	100,8%	19,91	99,6%
	0,55	110,0%	0,93	93,0%	1,80	90,0%	5,15	103,0%	10,71	107,1%	19,39	97,0%
	0,56	112,0%	0,92	92,0%	1,88	94,0%	4,95	99,0%	10,27	102,7%	19,55	97,8%
	0,60	120,0%	1,06	106,0%	1,97	98,5%	5,12	102,4%	10,34	103,4%	19,60	98,0%
	0,59	118,0%	1,09	109,0%	2,05	102,5%	4,86	97,2%	10,59	105,9%	20,11	100,6%
	0,59	118,0%	0,97	97,0%	2,05	102,5%	4,94	98,8%	10,10	101,0%	20,52	102,6%
	0,54	108,0%	1,08	108,0%	2,09	104,5%	4,83	96,6%	10,14	101,4%	20,07	100,4%
Média	0,55	110,2%	1,01	100,8%	2,00	99,9%	4,93	98,6%	10,23	102,3%	19,80	99,0%
S	0,03		0,07		0,10		0,13		0,25		0,37	
CV	6,1%		6,7%		5,1%		2,7%		2,5%		1,9%	
t <sub>calc</sub>	4,82		0,35		0,06		1,21		2,03		1,57	

Tabela 3.27 - Resultados dos ensaios de recuperação para o ECD2 (valores do 3º teste de linearidade).

ECD2												
#	0,5 ppt		1 ppt		2 ppt		5 ppt		10 ppt		20 ppt	
	[TCA]	R	[TCA]	R	[TCA]	R	[TCA]	R	[TCA]	R	[TCA]	R
01	0,52	104,0%	0,98	98,0%	2,01	100,5%	4,89	97,8%	9,78	97,8%	20,77	103,9%
02	0,49	98,0%	1,06	106,0%	2,06	103,0%	4,57	91,4%	10,09	100,9%	20,13	100,7%
03	0,49	98,0%	1,05	105,0%	2,02	101,0%	4,75	95,0%	10,08	100,8%	20,96	104,8%
04	0,51	102,0%	1,00	100,0%	2,07	103,5%	4,91	98,2%	10,13	101,3%	21,00	105,0%
05	0,50	100,0%	1,01	101,0%	1,99	99,5%	4,84	96,8%	10,31	103,1%	20,49	102,5%
06	0,49	98,0%	1,01	101,0%	1,99	99,5%	4,99	99,8%	9,98	99,8%	20,50	102,5%
07	0,52	104,0%	0,94	94,0%	1,93	96,5%	4,76	95,2%	9,97	99,7%	19,99	100,0%
08	0,55	110,0%	0,94	94,0%	2,12	106,0%	4,96	99,2%	9,92	99,2%	18,82	94,1%
09	0,52	104,0%	1,02	102,0%	1,92	96,0%	5,04	100,8%	9,94	99,4%	20,34	101,7%
10	0,47	94,0%	1,04	104,0%	1,96	98,0%	5,06	101,2%	10,69	106,9%	20,70	103,5%
Média	0,51	101,2%	1,01	100,5%	2,01	100,4%	4,88	97,5%	10,09	100,9%	20,37	101,9%
S	0,02		0,04		0,06		0,15		0,25		0,64	
CV	4,5%		4,1%		3,2%		3,1%		2,5%		3,1%	
t <sub>calc</sub>	0,84		0,38		0,35		2,20		1,10		1,84	

### 3.6. Gama de Trabalho

Para que a gama de trabalho seja considerada válida, é necessário que o intervalo entre a concentração inferior e superior do analito demonstre um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade.

De acordo com os resultados obtidos para a precisão, exatidão e linearidade em ambos os cromatógrafos, conclui-se que a gama de trabalho encontra-se bem definida.

Além destes critérios, uma vez que a metodologia envolve o traçado de uma curva de calibração, é necessária a realização do teste de Fisher, a fim de analisar a homogeneidade das variâncias do primeiro e último padrão da curva. O teste foi realizado com auxílio da ferramenta de análise de dados do *software Excel*. Os resultados encontram-se na Tabela 3.28, para o ECD1 e ECD2:

Tabela 3.28 - Resultados do teste de análise de homogeneidade de variâncias dos padrões 0,50 e 20 ppt, do ECD1 e ECD2.

[TCA]	ECD1		ECD2	
	0,5 ppt	20 ppt	0,5 ppt	20 ppt
<b>Média</b>	0,55	19,80	0,51	20,37
<b>Variância</b>	0,001	0,140	5,16E-04	0,406
<b>#</b>	10	10	10	10
<b>Graus de liberdade</b>	9	9	9	9
<b>F</b>	<b>0,0080</b>		<b>0,0013</b>	
<b>F<sub>crítico</sub></b>	<b>0,3146</b>		<b>0,3146</b>	

Como, para ambos os cromatógrafos,  $F < F_{\text{crítico}}$  pode-se concluir, com um nível de confiança de 95%, que não existem diferenças significativas entre as variâncias.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se considerar que a gama de trabalho definida se encontra bem ajustada.

### 3.7. Robustez

Para o estudo da robustez foram avaliados quatro parâmetros:

- Volume de macerado adicionado;
- Volume de padrão interno adicionado
- Quantidade de sal adicionado;
- Qualidade do sal adicionado.

As variações de cada parâmetro encontram-se na Tabela 2.4.

Foi então corrida a amostra A, seguindo o modo de preparação do método, e posteriormente as restantes preparações, com as alterações em relação ao método já enunciadas. Os resultados de cada um dos ensaios encontram-se na Tabela 3.29.

Tabela 3.29 - Resultados cromatográficos da primeira série de ensaios do teste da robustez do método.

#	Ensaio A [TCA]	Ensaio B [TCA]	Ensaio C [TCA]	Ensaio D [TCA]	Ensaio E [TCA]	Ensaio F [TCA]	Ensaio G [TCA]	Ensaio H [TCA]
01	1,07	1,20	1,06	1,08	0,94	1,22	1,25	1,02
02	1,07	1,29	1,13	0,90	0,96	1,28	1,11	1,04
03	1,14	1,30	1,34	1,05	1,10	1,18	1,14	1,03
04	1,07	1,26	1,33	1,03	1,24	1,16	1,22	1,10
05	1,19	1,25	1,13	1,13	1,18	1,14	1,35	1,05
06	1,24	1,06	1,26	0,92	1,22	1,42	1,32	-
07	1,08	1,11	1,19	1,19	1,10	1,06	1,29	0,91
08	1,16	1,07	1,32	0,99	1,29	1,06	1,31	0,84
09	1,18	1,18	1,02	1,07	1,18	1,31	1,33	1,19
10	1,24	1,04	1,39	1,04	1,12	1,09	1,33	1,08
Média	1,14	1,18	1,22	1,04	1,13	1,19	1,27	1,03
$S^2$	0,069	0,099	0,129	0,088	0,114	0,117	0,084	0,103

Onde,

$S^2$  – variância da amostra.

Foi então realizado o *teste – F* para cada par de ensaios A:X, sendo X cada um dos restantes ensaios, para avaliar a existência de diferenças significativas entre as variâncias. Dependendo do resultado do *teste – F*, foi realizado o *teste – t* para variâncias iguais ou desiguais, para os mesmos pares.

O teste de hipóteses do *teste – t* bilateral será:

$$\begin{array}{ll} \text{Hipótese nula} & H_0: S_1^2 = S_2^2 \\ \text{Hipótese alternativa} & H_1: S_1^2 \neq S_2^2 \end{array}$$

Rejeita-se a hipótese nula caso  $t_{calc} > t_{crítico}$ .

Os testes foram realizados com recurso à ferramenta de análise de dados do *software Excel*.

Os resultados do *teste – F* e *teste – t* encontram-se na Tabela 3.30

Dos resultados obtidos é possível observar que o método é robusto para as variações de  $\pm 2\%$  do volume de macerado adicionado, para a variação de  $-5\%$  do volume de padrão interno adicionado e para a diminuição de sal adicionado, adicionando apenas 2,5 gramas de sal. Para os restantes ensaios o método não se apresentou robusto.

O facto de o método não ter apresentado robustez para o teste H, onde apenas foi alterada a qualidade do sal, aliado à concentração da maceração ser relativamente baixa, levou a que o teste tivesse sido repetido para macerações com maiores concentrações de contaminante.

Tabela 3.30 - Resultados da primeira série de ensaios do teste da robustez do método.

Ensaio		Teste – F		Teste – t			Robustez
A-B	$F_B$	0,48	Desiguais	$t_{calc B}$	0,84	$t_{calc B} < t_{crítico}$	Robusto
	$F_{crítico}$	0,31		$t_{crítico}$	2,12		
A-C	$F_C$	0,29	Iguais	$t_{calc C}$	1,58	$t_{calc C} < t_{crítico}$	Robusto
	$F_{crítico}$	0,31		$t_{crítico}$	2,10		
A-D	$F_D$	0,61	Desiguais	$t_{calc D}$	2,94	$t_{calc D} > t_{crítico}$	Não robusto
	$F_{crítico}$	0,31		$t_{crítico}$	2,11		
A-E	$F_E$	0,36	Desiguais	$t_{calc E}$	0,26	$t_{calc E} < t_{crítico}$	Robusto
	$F_{crítico}$	0,31		$t_{crítico}$	2,13		
A-F	$F_F$	0,35	Desiguais	$t_{calc F}$	1,12	$t_{calc F} < t_{crítico}$	Robusto
	$F_{crítico}$	0,31		$t_{crítico}$	2,13		
A-G	$F_G$	0,67	Desiguais	$t_{calc G}$	3,53	$t_{calc G} > t_{crítico}$	Não robusto
	$F_{crítico}$	0,31		$t_{crítico}$	2,11		
A-H	$F_H$	0,45	Desiguais	$t_{calc H}$	2,84	$t_{calc H} > t_{crítico}$	Não robusto
	$F_{crítico}$	0,31		$t_{crítico}$	2,14		

Para o segundo foi utilizada uma solução resultante de macerações de apara com níveis de contaminação entre os 3 e os 4 ppt. Os resultados do segundo teste encontram-se na Tabela 3.31.

Tabela 3.31 - Resultados cromatográficos da segunda série de ensaios do teste da robustez do método.

#	Ensaio A	Ensaio B	Ensaio C	Ensaio D	Ensaio E	Ensaio F	Ensaio G	Ensaio H
	[TCA]	[TCA]	[TCA]	[TCA]	[TCA]	[TCA]	[TCA]	[TCA]
01	2,86	4,09	3,80	2,71	4,53	3,66	3,66	4,23
02	2,64	4,26	3,87	2,99	3,59	3,45	3,64	3,63
03	2,63	4,42	4,48	2,83	4,39	3,76	3,32	3,44
04	3,01	3,48	3,63	3,06	3,91	3,14	3,52	3,42
05	2,77	3,81	3,94	3,22	3,57	3,78	3,70	3,05
06	2,74	4,12	3,82	3,63	3,34	3,37	3,99	4,03
07	3,41	3,85	3,45	3,43	3,66	3,94	3,76	3,37
08	4,14	3,38	3,46	3,38	3,20	3,58	3,75	3,75
09	3,66	4,01	4,03	3,30	3,78	3,50	3,72	4,85
10	-	3,51	4,18	3,48	2,72	3,86	3,93	3,20
Média	3,10	3,89	3,87	3,20	3,67	3,60	3,70	3,70
$S^2$	0,278	0,123	0,101	0,089	0,286	0,060	0,036	0,294

Devido a um erro cromatográfico só foram obtidos nove resultados da amostra do Ensaio A – o ensaio referência.

Foram então realizados, novamente, o teste – F e teste – t, para cada par de ensaios A:X, sendo X cada um dos restantes ensaios.

O teste de hipóteses do teste – t bilateral será o mesmo.

Os resultados dos testes encontram-se na Tabela 3.32.



Tabela 3.32 - Resultados da segunda série de ensaios do teste da robustez do método.

Ensaio	Teste – F			Teste – t			Robustez
A-B	$F_B$	2,27	Iguais	$t_{calc B}$	3,92	$t_{calc B} > t_{crítico}$	Não robusto
	$F_{crítico}$	3,23		$t_{crítico}$	2,11		
A-C	$F_C$	2,76	Iguais	$t_{calc C}$	3,90	$t_{calc C} > t_{crítico}$	Não robusto
	$F_{crítico}$	3,23		$t_{crítico}$	2,11		
A-D	$F_D$	3,13	Iguais	$t_{calc D}$	0,55	$t_{calc D} < t_{crítico}$	Robusto
	$F_{crítico}$	3,23		$t_{crítico}$	2,11		
A-E	$F_E$	0,97	Desiguais	$t_{calc E}$	2,35	$t_{calc E} > t_{crítico}$	Não robusto
	$F_{crítico}$	0,30		$t_{crítico}$	2,11		
A-F	$F_F$	4,62	Desiguais	$t_{calc F}$	2,64	$t_{calc F} > t_{crítico}$	Não robusto
	$F_{crítico}$	3,23		$t_{crítico}$	2,20		
A-G	$F_G$	7,70	Desiguais	$t_{calc G}$	3,25	$t_{calc G} > t_{crítico}$	Não robusto
	$F_{crítico}$	3,23		$t_{crítico}$	2,23		
A-H	$F_H$	0,95	Desiguais	$t_{calc H}$	2,45	$t_{calc H} > t_{crítico}$	Não robusto
	$F_{crítico}$	0,30		$t_{crítico}$	2,11		

Dos resultados obtidos do segundo teste verifica-se que o método apenas se apresentou robusto para uma variação de +5% na adição de padrão interno (105 µl) – ensaio D. O mesmo ensaio, no primeiro teste de robustez do método, tinha-se apresentado não robusto.

Da avaliação da robustez pode-se apenas concluir que o método, neste teste, não se mostrou constante, sendo impossível avaliar para que parâmetros o método é robusto.

### 3.8. Incerteza Global Associada ao Resultado

Para a estimativa da incerteza associada ao procedimento analítico seguiu-se a abordagem “passo a passo” combinada com as fontes de incerteza baseadas em dados de validação, como recomendado pelo guia (EURACHEM/CITAC, 2008).

#### 3.8.1. Especificação do Mensurando

A equação que descreve o mensurando,  $C_{TCA}$ , (concentração final de 2,4,6-tricloroanisol em ppt) é:

$$C_{TCA} = \frac{m_{TCA}}{V_{Amostra}} \quad \text{Eq. 66}$$

Onde,

$m_{TCA}$  – massa TCA em (ng);

$V_{Amostra}$  – volume da amostra (l).

O analito encontra-se numa solução alcoólica a 12% (v/v) preparada como amostras padrão ou como amostras provenientes de macerações.

### 3.8.2. Identificação das Componentes de Incerteza

Na figura seguinte estão representadas num diagrama causa-efeito (também conhecido por diagrama de Ishikawa ou diagrama de “espinha de peixe”) as fontes de incerteza identificadas para a determinação em análise.

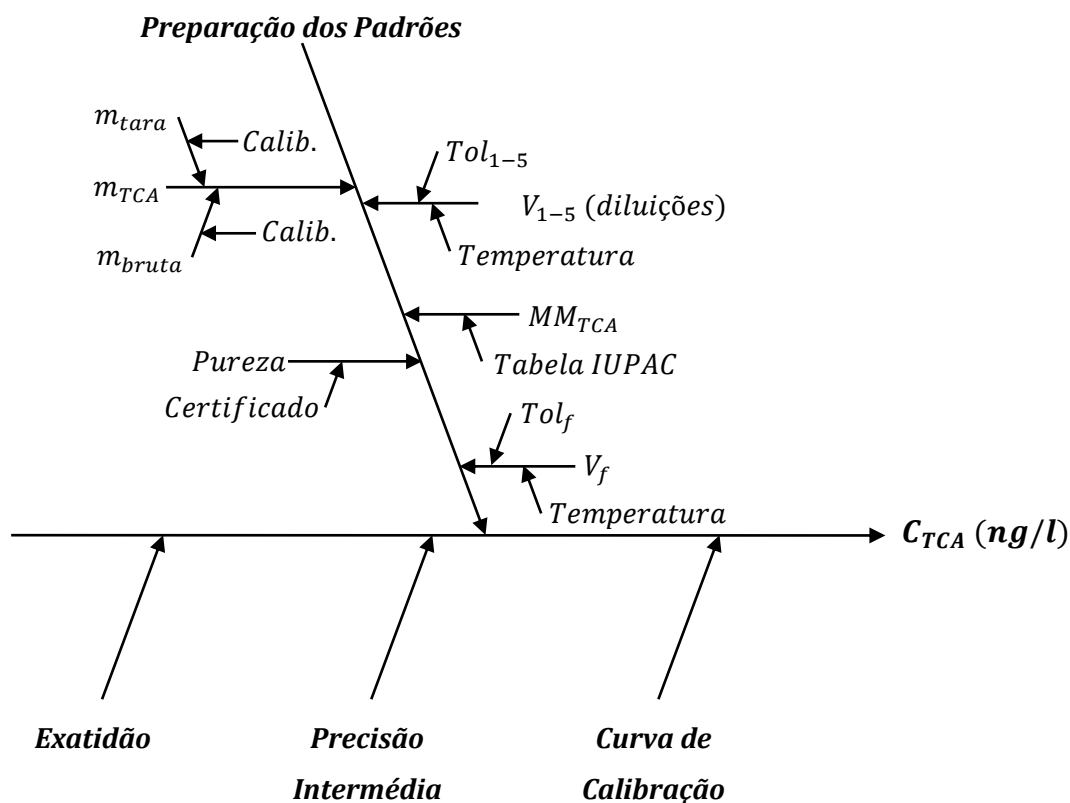


Figura 3.7 - Diagrama Causa-Efeito para a determinação de tricloroanisol.

### 3.8.3. Quantificação das Componentes de Incerteza

Para se proceder à determinação da incerteza do método, foi efetuado um levantamento dos reagentes, equipamentos e materiais envolvidos, assim como quando aplicável, dos seus erros e tolerâncias.

### 3.8.3.1. Incerteza Associada à Massa Molar do TCA

Para o cálculo da incerteza associada à massa molar do tricloroanisol recorreu-se à tabela fornecida pela IUPAC, onde constam as incertezas para um elevado número de elementos.

Tabela 3.33 - Valores de incerteza padrão associados a cada composto da molécula de TCA.

Composto	MM (g/mol)	Incerteza Expandida (g)	Incerteza Padrão
<b>Carbono</b>	12,0107	0,0008	0,00046
<b>Cloro</b>	35,453	0,002	0,00115
<b>Oxigénio</b>	15,9994	0,0003	0,00017
<b>Hidrogénio</b>	1,00794	0,00007	0,00004

A incerteza associada à massa molar é calculada tendo em conta o número de átomos que cada composto presente na molécula, tendo o TCA a fórmula molecular  $C_7H_5Cl_3O$ , através da seguinte equação:

$$u_{MM} = \sqrt{(7 \times u_{MM_C})^2 + (5 \times u_{MM_H})^2 + (3 \times u_{MM_{Cl}})^2 + (u_{MM_O})^2} \quad \text{Eq. 67}$$

De onde foram obtidos os seguintes resultados:

Tabela 3.34 - Incerteza padrão associada à massa molar de TCA.

MM (g/mol)	$u_{MM}$ (g/mol)	$u_{MM}/MM$
211,47	0,0047	$2,24 \times 10^{-5}$

### 3.8.3.2. Incerteza Associada à Pureza do TCA

A pureza do TCA utilizado na preparação da solução-mãe é de 99,9%

$$u_{Pur} = \frac{\frac{1 - 0,999}{2}}{\sqrt{3}} \quad \text{Eq. 68}$$

Tabela 3.35 - Incerteza padrão associada à pureza de TCA.

Pur	$u_{Pur}$	$u_{Pur}/Pur$
0,999	0,00029	0,000288

### 3.8.3.3. Incerteza Associada à Pesagem do TCA

A massa de TCA necessária para a preparação da solução-mãe é de 0,01 grama. Esta pesagem é feita numa balança com uma resolução de 0,0001 g e com um erro máximo admissível (EMA) de 0,0005 g.

A incerteza deste passo é calculada da seguinte forma:

$$u_m = \sqrt{2 \times \left(\frac{0,0005}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Eq. 69}$$

Tabela 3.36 - Incerteza padrão associada à pesagem de TCA.

EMA (g)	m (g)	$u_m$	$u_m/m$
0,0005	0,01	0,00041	0,04082

### 3.8.3.4. Incertezas Associadas à Preparação e Diluições da Solução-Mãe

A solução-mãe de TCA (solução 1) tem uma concentração de 0,1 g/l e é preparada pelo departamento I&D da Amorim & Irmãos.

A solução é preparada num balão volumétrico de 100 ml  $\pm$  0,1 ml, adicionando 0,01 g de TCA a 100 ml de solução hidroalcoólica.

Numa primeira fase é feita uma diluição da solução-mãe de 0,01 g/l ( $10^5$  ppb) para 100 ppb (solução 2). Para tal diluem-se 0,1 ml da solução-mãe em 100 ml de solução hidroalcoólica, recorrendo a uma micropipeta, com tolerância de 0,0002 ml (todas as tolerâncias de volumes medidos em micropipeta foram obtidas através do manual da Socorex, (Socorex), para o volume utilizado).

A solução 2 é novamente diluída para a solução 3, de 100 ml, com uma concentração de 10 ppb. Para tal recorre-se a uma macropipeta com uma tolerância de 0,06 ml.

Esta diluição é repetida mais duas vezes, utilizando os mesmos volumes, para uma solução de 1 e 0,1 ppb, solução 4 e 5, respetivamente. Todos os volumes finais de cada diluição são de 100 ml, sendo que os balões volumétricos possuem um erro de 0,1 ml.

O cálculo da incerteza da medição de volume da preparação da solução mãe é calculado através da seguinte equação:

$$u_{V_1} = \sqrt{\left(\frac{0,1}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{100 \times 2 \times 0,207 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Eq. 70}$$

Tabela 3.37 - Incerteza padrão associada à medição de volume na preparação da solução-mãe.

<b>V<sub>1</sub> (ml)</b>	<b>Tol (ml)</b>	<b>u<sub>v<sub>1</sub></sub></b>	<b>u<sub>T<sub>1</sub></sub></b>	<b>u<sub>v<sub>1</sub></sub>/V<sub>1</sub></b>
100	0,1	0,0625	0,0239	0,00062

Nas equações seguintes encontra-se representado um exemplo dos cálculos para a determinação da incerteza associada à medição de volume e associada à diluição de uma solução, neste caso à diluição da solução-mãe para a solução 2.

Da solução-mãe são pipetados 0,1 ml (V<sub>2</sub>), adicionados posteriormente a uma solução hidroalcoólica de V<sub>f</sub> = 100 ml. Temos então a incerteza associada à medição dos volumes V<sub>2</sub> e V<sub>f</sub>, volume inicial e volume final, respetivamente:

$$u_{V_2} = \frac{0,0002}{\sqrt{3}} = 0,115 \times 10^{-3} \quad \text{Eq. 71}$$

$$u_{V_f} = \frac{0,1}{\sqrt{3}} = 0,0577 \quad \text{Eq. 72}$$

O cálculo da incerteza associada a esta diluição é feito através da Equação 73.

$$\frac{u_{dil1}}{F} = \sqrt{\left(\frac{0,115 \times 10^{-3}}{0,1}\right)^2 + \left(\frac{0,0577}{100}\right)^2} \quad \text{Eq. 73}$$

Como foi enunciado no subcapítulo 1.8.2.3.1 Incerteza Associada à Concentração de uma Solução Padrão, o fator da temperatura foi desprezado para o cálculo das incertezas associadas às diluições.

Na Tabela 3.38 - Incerteza padrão associadas às medições de volume e diluições. encontram-se os resultados das incertezas associadas às diluições realizadas.

Tabela 3.38 - Incerteza padrão associadas às medições de volume e diluições.

<b>Diluições</b>	<b>V<sub>Inicial</sub> (ml)</b>	<b>V<sub>Final</sub> (ml)</b>	<b>Tol (ml)</b>	<b>Concentração (ppb)</b>	<b>u<sub>v<sub>i</sub></sub></b>	<b>(u<sub>dil</sub>/F)<sub>i</sub></b>
2	0,1	100	0,0001	100	0,000115	0,001291
3	10	100	0,06	10	0,034641	0,003464
4	10	100	0,06	1	0,034641	0,003464
5	10	100	0,06	0,1	0,034641	0,003464

### 3.8.3.5. Incertezas Associadas à Preparação da Amostra

As incertezas associadas à preparação da amostra de maceração dizem respeito à medição do volume de macerado e padrão interno. Na Tabela 3.39 estão representados os resultados de ambas as incertezas.

Tabela 3.39 - Incertezas associadas à preparação da Amostra.

	V (ml)	Tol (ml)	$u_V$	$u_T$	$u_V/V$
<b>Maceração</b>	100	0,06	0,0346	0,0024	0,00062
<b>Padrão Interno</b>	0,2	0,0004	0,0002	$4,78 \times 10^{-5}$	0,00118

### 3.8.3.6. Incerteza Associada à Interpolação da Curva de Calibração

A calibração do ECD1 foi realizada a 28 de janeiro de 2015, e foram realizadas duas réplicas por cada nível de concentração. Os resultados encontram-se na Tabela 3.40.

Tabela 3.40 - Resultados das réplicas da curva de calibração do cromatógrafo ECD1. Os valores sublinhados correspondem aos valores utilizados na definição da curva de calibração.

Padrão	Área TCA	Área TCA <sub>3</sub>	$[TCA]/[TCA_3]$	$A\ TCA/A\ TCA_3$
<b>0,5 ppt</b>	25,0	1003,1	0,025	0,0249
	27,2	821,8		<u>0,0331</u>
<b>1 ppt</b>	44,7	652,7	0,05	<u>0,0685</u>
	30,7	1167,8		0,0263
<b>2 ppt</b>	92,9	957,3	0,1	0,0970
	80,0	612,9		<u>0,1305</u>
<b>5 ppt</b>	274,7	759,3	0,25	0,3618
	269,9	769,2		<u>0,3509</u>
<b>10 ppt</b>	462,5	666,8	0,5	<u>0,6936</u>
	583,3	799,4		0,7297
<b>20 ppt</b>	825,1	677,5	1	1,2177
	891,6	660,5		<u>1,3499</u>

O declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação e correspondente incerteza associada à curva de calibração encontram-se na Tabela 3.41.

Tabela 3.41 - Declive e ordenada na origem da curva de calibração e respetiva incerteza associada.

$a$	$b$	$r^2$	$S_{y/x}$	$u_{Reta1}$
1,3546	0,0032	0,9997	0,01005	0,00606

A calibração do ECD2 foi realizada a 26 de janeiro de 2015, e foram realizadas três réplicas por cada nível de concentração. Os resultados encontram-se na Tabela 3.42.

Tabela 3.42 - Resultados das réplicas da curva de calibração do cromatógrafo ECD2. Os valores sublinhados correspondem aos valores utilizados na definição da curva de calibração.

Padrão	Área TCA	Área TCA <sub>3</sub>	$\frac{[TCA]}{[TCA_3]}$	$\frac{A\ TCA}{A\ TCA_3}$
<b>0,5 ppt</b>	112,2	2809,9	0,025	<u>0,0399</u>
	121,6	1888,4		0,0644
	150,6	2274,7		0,0662
<b>1 ppt</b>	234,6	2067,4	0,05	0,1135
	242,0	2933,2		<u>0,0825</u>
	303,7	2568,2		0,1183
<b>2 ppt</b>	421,0	2341,8	0,1	0,1798
	432,6	2495,2		0,1734
	408,8	2438,6		<u>0,1676</u>
<b>5 ppt</b>	731,1	2060,4	0,25	0,3548
	940,4	2085,2		0,4510
	1239,2	2965,7		<u>0,4178</u>
<b>10 ppt</b>	2188,6	2805,2	0,5	0,7802
	2325,8	2722,4		0,8543
	2246,5	2681,2		<u>0,8379</u>
<b>20 ppt</b>	3543,5	2256,1	1	1,5706
	4000,1	2475,7		1,6157
	3662,3	2147,2		<u>1,7056</u>

O declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação e correspondente incerteza associada à curva de calibração encontram-se na Tabela 3.43.

Tabela 3.43 - Declive e ordenada na origem da curva de calibração do cromatógrafo ECD2 e respetiva incerteza associada.

<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>S<sub>y/x</sub></i>	<i>u<sub>Reta2</sub></i>
1,7058	-0,0054	0,9999	0,00613	0,0029

Os resultados sublinhados correspondem aos valores utilizados para o desenho de cada curva de calibração.

Para o cálculo da incerteza padrão combinada é utilizado o valor mais alto de *u<sub>Reta</sub>* mais elevado, valor correspondente ao cromatógrafo ECD1, com *u<sub>Reta</sub>* = 0,0061.

### 3.8.3.7. Incerteza Associada à Precisão do Método

Uma vez que, nos ensaios químicos, a precisão é uma componente maioritária da incerteza global, foi avaliada a incerteza associada a esta.

A precisão utilizada para o cálculo da incerteza associada à precisão do método foi a precisão intermédia, pois esta consegue refletir eventuais variações do desempenho do método em função de alterações de parâmetros experimentais que habitualmente são mantidos constantes no mesmo dia.

Os resultados da precisão intermédia encontram-se representados na Tabela 3.44.

Tabela 3.44 - Resultados da precisão intermédia, para cada cromatógrafo, e respetivo desvio-padrão relativo.

#	ECD1		ECD2	
	Amostra A	Amostra B	Amostra A	Amostra B
	[TCA]	[TCA]	[TCA]	[TCA]
1	2,52	10,55	1,98	8,93
	2,57	10,03	1,98	9,36
	2,58	9,24	1,99	10,9
2	3,11	9,52	2,19	10,04
	2,81	9,63	2,09	9,26
	2,73	9,37	1,99	9,56
3	2,86	8,57	1,89	9,76
	2,59	8,81	1,94	9,13
	2,82	8,47	1,93	9,65
4	2,52	9,63	2,01	9,40
	2,96	9,44	1,95	8,68
	2,45	9,84	1,96	9,82
5	3,48	9,60	1,98	9,6
	2,60	9,59	1,95	9,24
	3,64	10,17	1,93	9,29
<b>Média</b>	2,82	9,50	1,98	9,51
<b>S' <sub>PI</sub></b>	<b>0,1259</b>	0,0596	0,0366	<b>0,0547</b>

Para o cálculo da incerteza associada à precisão intermédia, para cada cromatógrafo, foi utilizado o valor do desvio-padrão mais elevado, de cada cromatógrafo (destacado a negrito). Os resultados da incerteza associada à precisão encontram-se na Tabela 3.45.

Tabela 3.45 - Incertezas padrão associadas à precisão, de cada cromatógrafo.

	<b><i>u<sub>PI</sub></i></b>
<b>ECD1</b>	0,0325
<b>ECD2</b>	0,0141

### 3.8.3.8. Incerteza Associada à Exatidão do Método

Uma das formas de estimar o erro sistemático de uma medição, é pela média de resultados da análise replicada de uma amostra com teor conhecido, onde é minimizado o erro aleatório da medição.

A metodologia seguida para avaliar a exatidão do método foi através de ensaios de recuperação, com recurso à fortificação de amostras brancas.

Esta incerteza é calculada através da Equação 51, representada no subcapítulo 1.8.2.3.4 Incerteza Associada à Exatidão do Método, onde,

$$u(C_{fortificada}) = \frac{C_{fortificada}}{\sqrt{3}} \quad \text{Eq. 74}$$



Os resultados dos ensaios de recuperação e respectivas incertezas associadas à exatidão, de cada concentração e cromatógrafo, encontram-se nas Tabela 3.46 e Tabela 3.47.

Tabela 3.46 - Resultados dos ensaios de recuperação para cada concentração, no cromatógrafo 1, e respetiva incerteza associada.

#	ECD1					
	0,5 ppt	1 ppt	2 ppt	5 ppt	10 ppt	20 ppt
01	108,0%	97,0%	105,0%	99,6%	100,2%	97,6%
02	104,0%	99,0%	103,0%	96,8%	100,4%	97,0%
03	102,0%	97,0%	96,0%	94,0%	99,7%	100,0%
04	102,0%	110,0%	103,0%	98,4%	100,8%	99,6%
05	110,0%	93,0%	90,0%	103,0%	107,1%	97,0%
06	112,0%	92,0%	94,0%	99,0%	102,7%	97,8%
07	120,0%	106,0%	98,5%	102,4%	103,4%	98,0%
08	118,0%	109,0%	102,5%	97,2%	105,9%	100,6%
09	118,0%	97,0%	102,5%	98,8%	101,0%	102,6%
10	108,0%	108,0%	104,5%	96,6%	101,4%	100,4%
$\bar{R}_m$	110,2%	100,8%	99,9%	98,6%	102,3%	99,0%
$S$	0,03	0,07	0,10	0,13	0,25	0,37
$u_{R_m}$	0,0330	0,0306	0,0226	0,0119	0,0115	0,0083

Tabela 3.47 - Resultados dos ensaios de recuperação para cada concentração, no cromatógrafo 1, e respetiva incerteza associada.

#	ECD2					
	0,5 ppt	1 ppt	2 ppt	5 ppt	10 ppt	20 ppt
01	104,0%	98,0%	100,5%	97,8%	97,8%	103,9%
02	98,0%	106,0%	103,0%	91,4%	100,9%	100,7%
03	98,0%	105,0%	101,0%	95,0%	100,8%	104,8%
04	102,0%	100,0%	103,5%	98,2%	101,3%	105,0%
05	100,0%	101,0%	99,5%	96,8%	103,1%	102,5%
06	98,0%	101,0%	99,5%	99,8%	99,8%	102,5%
07	104,0%	94,0%	96,5%	95,2%	99,7%	100,0%
08	110,0%	94,0%	106,0%	99,2%	99,2%	94,1%
09	104,0%	102,0%	96,0%	100,8%	99,4%	101,7%
10	94,0%	104,0%	98,0%	101,2%	106,9%	103,5%
$\bar{R}_m$	101,2%	100,5%	100,4%	97,5%	100,9%	101,9%
$S$	4,5%	4,2%	3,2%	3,0%	2,5%	3,2%
$u_{R_m}$	0,0206	0,0187	0,0142	0,0132	0,0115	0,0145

Para o cálculo da incerteza padrão combinada, será utilizado valor mais elevado de incerteza associada à exatidão dos dois cromatógrafos. Esse valor corresponde à incerteza padrão da fortificação de 0,50 ppt, do ECD1, de valor  $u_{R_m} = 0,0330$ .

É necessário avaliar a possível presença de desvios sistemáticos relevantes que afetem os resultados. Esta avaliação é feita através de um teste  $t - student$  para um nível de confiança de 97,5%.

$$t = \frac{|1 - 110,2\%|}{0,0330} = 3,0906 > t_{tab} = 2,2622 \quad \text{Eq. 75}$$

Uma vez que  $\bar{R}_m = 110,2\%$  é significativamente diferente de 1, o resultado da incerteza padrão associada à exatidão é corrigido, de acordo com a Equação 54, presente no subcapítulo 1.8.2.3.4 Incerteza Associada à Exatidão do Método:

$$u'_{R_m} = \frac{u_{R_m}}{\bar{R}_m} = 0,0299 \quad \text{Eq. 76}$$

### 3.8.4. Incerteza Padrão Combinada

O cálculo da incerteza padrão combinada baseia-se na Lei da Propagação das Incertezas (GUM, 2008).

$$u(y) = y \times \sqrt{\left(\frac{u_X}{X}\right)_i^2 + \dots + \left(\frac{u_X}{X}\right)_n^2 + (u_K)_j^2 + \dots + (u_K)_m^2} \quad \text{Eq. 77}$$

Na Tabela 3.48 estão presentes todos os parâmetros identificados e quantificáveis que contribuem para a incerteza do método.

*Tabela 3.48 - Incertezas padrão dos parâmetros identificados e quantificáveis que contribuem para a incerteza do método.*

$u_{MM}/MM$	$22,4 \times 10^{-6}$	Incerteza padrão associada à massa molar do TCA
$u_{Pur}/P_{Pur}$	$0,289 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à pureza do TCA
$u_m/m$	$40,8 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à pesagem do TCA
$u_{V_1}/V_1$	$0,625 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à preparação da solução-mãe
$(u_{V/F})_2$	$1,29 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à primeira diluição
$(u_{V/F})_3$	$3,46 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à segunda diluição
$(u_{V/F})_4$	$3,48 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à terceira diluição
$(u_{V/F})_5$	$3,48 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à quarta diluição
$u_{V_{Mac}}/V_{Mac}$	$3,47 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à medição do volume de maceração
$u_{V_{PInt}}/V_{PInt}$	$1,12 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à medição do volume de TCA <sub>3</sub>
$u_{Reta}$	$6,06 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à curva de calibração
$u_{PI}$	$32,5 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à precisão
$u'_{R_m}$	$29,9 \times 10^{-3}$	Incerteza padrão associada à exatidão

Aplicando então a fórmula da Lei da Propagação, uma vez o cálculo da incerteza padrão combinada inclui produtos e quocientes, ao invés de apenas somas, temos:

$$u(y) = y \times 0,0609 \quad \text{Eq. 78}$$

Na Tabela 3.49 estão representadas as incertezas padrão combinadas para cada um dos níveis de concentração da curva de calibração.

Tabela 3.49 - Incertezas padrão combinadas de cada um dos níveis de concentração da curva de calibração.

[TCA] ppt	0,5	1	2	5	10	20
$u(y)$ ppt	0,03	0,06	0,12	0,30	0,61	1,22

Na Figura 3.8 é possível ver a contribuição de cada um dos parâmetros da incerteza. Os parâmetros que mais contribuem para incerteza são a incerteza associada à exatidão, à precisão intermédia e a incerteza associada à pesagem de TCA na preparação da solução-mãe, correspondendo a cerca de 80% da incerteza.

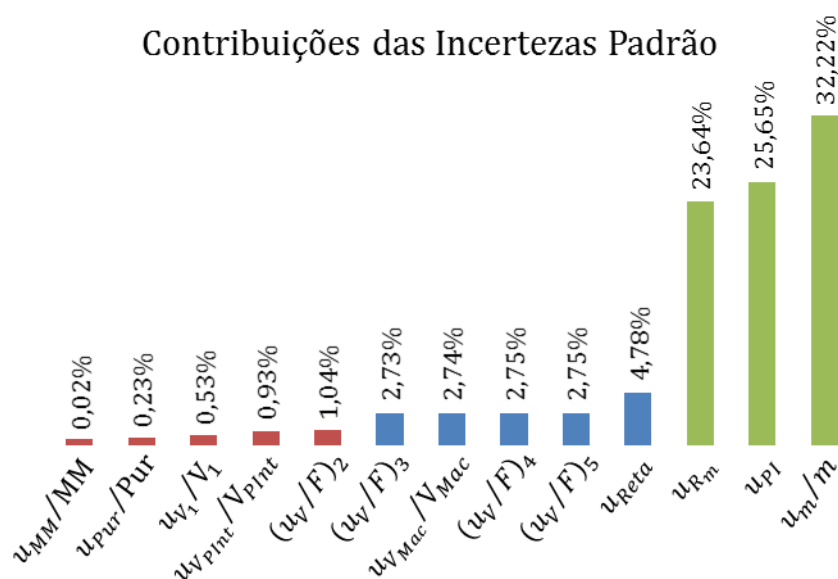


Figura 3.8 - Contribuições de cada Incerteza Padrão para a Incerteza Expandida.

### 3.8.5. Incerteza Expandida

Uma vez que o número de ensaios é conhecido, apesar de ser superior a 6, o fator de expansão  $k$  foi calculado para um nível de confiança de 97,5%. Da tabela  $t$  – *student* temos  $t_{(9;0,025)} = 2,2622$ .

A incerteza expandida será então:

$$U(y) = 2,2622 \times u(y) = 2,2622 \times y \times 0,0609 \quad \text{Eq. 79}$$

$$U(y) = y \times 0,1378 \quad \text{Eq. 80}$$

Na Tabela 3.50 estão representadas as incertezas padrão combinadas para cada um dos níveis de concentração da curva de calibração.

*Tabela 3.50 -Incertezas padrão combinadas de cada um dos níveis de concentração da curva de calibração, para um fator k=2,2622.*

<b>[TCA] ppt</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b>u(y) ppt</b>	0,03	0,06	0,12	0,30	0,61	1,22
<b>U(y) ppt</b>	0,07	0,14	0,28	0,70	1,37	2,75

A incerteza calculada representa, em termos percentuais, cerca de 14% do mensurando, para toda a gama de concentrações, que se consideram valores satisfatórios atendendo ao facto de serem usualmente aceites valores de incerteza na ordem dos 20 e 30%.

### 3.8.6. Expressão dos Resultados

Segundo (GUM, 2008), a expressão de resultados com incerteza é apresentada de acordo com a Equação 81:

$$u(y) = y \pm y \times 0,1378 \text{ ppt} \quad \text{Eq. 81}$$

Com um fator de expansão igual a 2,2622, o que permite associar ao resultado um nível de confiança de 97,5%.

## 3.9. Potência de Aquisição

No dia 19 de janeiro de 2015 foi aconselhado, ao laboratório de qualidade da UI Equipar, uma alteração da potência de dados de aquisição. Segundo o método seguido até então pelo laboratório, os cromatógrafos funcionavam com uma potência de aquisição de 10 Hz, o que correspondia a cerca de 35 pontos por pico. Esta frequência foi alterada para 5 Hz, que corresponde a cerca de 18 pontos por pico. As diferenças nas linhas de base e largura dos picos podem ser vistas nas figuras Figura 3.9 e Figura 3.10.

A diminuição do ruído na linha de base, consequente da diminuição da potência de aquisição dos cromatógrafos, é apenas observável no ECD2.

No primeiro cromatógrafo esta melhoria não é observada.

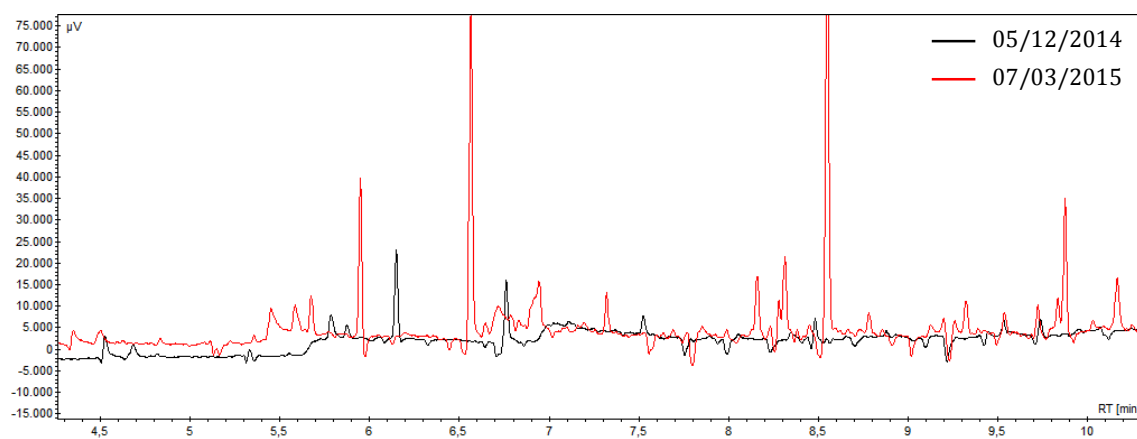


Figura 3.9 - Variação da linha de base e da largura dos picos com potência de aquisição de 10 e 5 Hz, no ECD1.

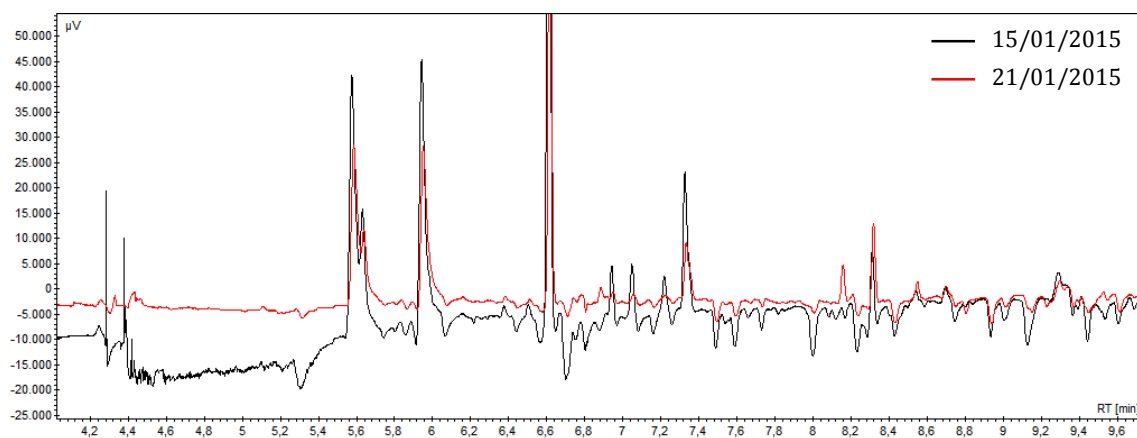


Figura 3.10 - Variação da linha de base e da largura dos picos com potência de aquisição de 10 e 5 Hz, no ECD2.



## 4. CONCLUSÕES

Verifica-se que a validação do método de determinação de TCA em solução hidroalcoólica por cromatografia gasosa é de grande importância no controlo de qualidade, dada a importância que este contaminante tem para o negócio.

Relativamente ao método estudado verificou-se que:

- Os padrões da curva de calibração normalizados ( $[TCA]/[TCA_3]$ ) correlacionam-se linearmente com a resposta em termos de área normalizada ( $A_{TCA}/A_{TCA_3}$ ). As curvas de calibração apresentam valores superiores a 0,9990, para ambos os cromatógrafos, nos testes finais da validação do parâmetro da linearidade. Para a validação da linearidade foram realizados cinco e três testes, para o ECD1 e ECD2, respetivamente. Apenas se verificou uma linearidade, aliada a coeficientes de variação inferiores a 10% e recuperações entre 80 e 120%, após corte da coluna e utilização de novos padrões, para o ECD1, e após a troca de coluna no ECD2.
- Os limites de deteção e quantificação, calculados através do método do desvio padrão residual da curva de calibração, apresentaram valores altos, com uma média de  $LOD = 1,56$  e  $0,85$  ppt, e  $LOQ = 4,73$  e  $2,59$  ppt, para o ECD1 e ECD2, respetivamente. Estes valores demasiado elevados podem ser explicados com o facto de se recorrer à curva de calibração onde são introduzidos mais erros, visto tratar-se de uma manipulação experimental, à qual se sucedem várias manipulações matemáticas que vão introduzindo erros sucessivos nos resultados. Pode também dever-se à possibilidade de não existência de homogeneidade de variâncias, falha da linearidade até à origem ou exclusão do branco da curva de calibração.
- Os limites de deteção e quantificação, calculados através do método do desvio padrão da amostra, encontram-se num intervalo de concentrações expectável, com os limites de deteção e quantificação de  $0,34$  e  $0,55$  ppt, respetivamente, para o ECD1, e com os limites de deteção e quantificação de  $0,29$  e  $0,43$  ppt, respetivamente, para o ECD2. Estes valores são um pouco elevados tendo em conta ponto inicial da curva de calibração, de  $0,50$  ppt. Todavia, ambos os cromatógrafos apresentaram coeficientes de variação inferiores a 10% nesta gama, pelo que se pode concluir que o limite de quantificação é igual ou inferior a  $0,50$  ppt. Esta admissão tem principal foco no ECD1 que apresentou um limite de quantificação de  $0,55$  ppt. Este resultado de limite de quantificação elevado pode-se dever ao facto de o teste ter sido realizado com recurso a padrões com  $0,2$  ppt. Possivelmente, ao

se realizar este teste com valores inferiores, os limites de detecção e quantificação diminuirão.

- No estudo da precisão em condições de repetibilidade, os limites de repetibilidade calculados para cada ponto da curva não foram ultrapassados, em ambos os cromatógrafos. Na avaliação da repetibilidade através do coeficiente de variação observou-se que este, em toda a gama de trabalho, apresentou valores inferiores a 10%. No estudo da precisão em condições de precisão intermédia, os limites de precisão intermédia não foram ultrapassados em nenhum ponto da curva de calibração. No estudo da precisão em condições de repetibilidade, estudada através de ensaios interlaboratoriais, os *z - score* obtidos nos 5 testes realizados entre 17 de abril de 2014 e 16 de janeiro de 2015, nunca ultrapassaram o valor máximo aceitável de 2. Deste modo conclui-se que o método, nas condições sob as quais os testes foram realizados, se apresenta preciso para toda a gama de trabalho.
- Para a avaliação da exatidão recorreu-se a ensaios de recuperação. Os resultados obtidos neste ensaio não ultrapassaram o intervalo definido previamente como critério de aceitação de 80 a 120% do valor fortificado na amostra padrão, provando que o método se apresenta exato na gama de trabalho definida, em cada um dos cromatógrafos.
- Em toda a gama de trabalho do método apresentou-se linear, preciso e exato. Além destes critérios, não foram verificadas diferenças significativas entre as variâncias das 10 réplicas de cada um dos pontos extremos da gama de trabalho, pelo que se conclui que a gama se encontra bem definida, em cada um dos cromatógrafos.
- No primeiro teste para a avaliação da robustez, o método apresentou-se robusto para uma variação de  $\pm 2\%$  do volume de macerado,  $-5\%$  do volume de padrão interno e para uma adição de 2,5 gramas de sal. No segundo teste, o método apresentou-se robusto para uma variação de  $+5\%$  do volume de padrão interno, sendo não robusto para os restantes ensaios. Uma vez que a robustez do método, em dois diferentes ensaios, apresentou resultados inconsistentes, nada se pode concluir.
- No teste da potência de aquisição, verificou-se uma melhoria no ruído da linha de base do ECD2. No entanto, esta melhoria não foi tão clara para o ECD1. Esta diferença de resultados da linha de base, entre os cromatógrafos, pode ser explicada com o facto de a comparação no ECD1 ter sido realizada com a mesma coluna, e no ECD2 os resultados observados após a alteração da potência de aquisição coincidirem com a alteração da coluna cromatográfica, revelando então uma melhoria mais substancial na linha de base.



De acordo com os resultados, o método de cromatografia gasosa com microextração em espaço de cabeça e detetor de captura de eletrões (SPME-GC/ECD), seguido pelo laboratório de qualidade da UI-Equipar da Amorim & Irmãos S.G.P.S. S.A. foi validado, possibilitando a determinação fiável do composto TCA, nas condições a que os testes finais foram realizados.

No entanto, apesar de validado, o método mostrou alguma inconsistência (a variação dos resultados de recuperação nos testes de linearidade, que levou às suas repetições, e os resultados dos testes da robustez) provavelmente ligada ao facto de se trabalhar com concentrações bastante baixas. Estas inconsistências levaram à necessidade de se realizar cinco e três testes, para o ECD1 e ECD2, respetivamente. No entanto, é necessário ter em conta que o quarto teste de linearidade do ECD1 terá apresentado maus resultados devido ao armazenamento das amostras padrão durante um período prolongado, como já foi referido.

Pode-se então concluir que, nas condições a que os testes foram realizados, o método se encontra validado, não sendo possível garantir que, após alterações das condições operatórias como o desgaste da coluna cromatográfica, a utilização de novos padrões ou novas curvas de calibração, o método apresente boas recuperações ou coeficientes de variação inferiores ao critério de aceitação. A estas condições operatórias junta-se o erro humano na preparação das amostras padrão e a incerteza associada à leitura dos picos cromatográficos, impossível de quantificar.

Após a validação do método foi calculada a incerteza do mesmo, seguindo a abordagem “passo a passo” combinada com os dados da validação. Para o cálculo da incerteza do método foram tidos em conta, na abordagem “passo a passo” as incertezas da massa molar e da pureza do TCA, da pesagem do mesmo aquando da preparação da solução-mãe, bem como das diluições a partir desta solução até às soluções finais, utilizadas pelo laboratório. Foram também tidas em conta as incertezas associadas à pipetagem de TCA e de  $\text{TCA}_3$  associadas à preparação das amostras padrão. Dos dados da validação foram calculadas as incertezas associadas à curva de calibração, à precisão e à exatidão. As incertezas que mais contribuem para a incerteza do método são a incerteza associada à pesagem do TCA aquando da preparação da solução-mãe, à precisão e à exatidão, perfazendo cerca de 80% da incerteza. A incerteza expandida, calculada para um nível de confiança de 97,5%, é de 13,78% do resultado obtido.

## 5. TRABALHO FUTURO

- Para a validação do método foram necessárias várias repetições dos testes, até que os resultados se encontrassem dentro dos critérios de aceitação pré-definidos. Parte da razão para a necessidade destas repetições poder-se-á prender com a preparação e utilização das soluções padrão. Estas soluções, tanto de TCA como de TCA<sub>3</sub> são utilizadas por longos períodos de tempo e por vezes mal seladas. Durante estes períodos, a concentração do analito pode diminuir através de evaporação ou mesmo impregnando-se na tampa de plástico do frasco. Aconselha-se a diminuição do intervalo de tempo em que estas soluções são utilizadas.
- Os padrões preparados no departamento I&D, utilizados para a calibração dos equipamentos têm associados vários processos com incerteza associada. Desde a preparação da solução-mãe onde é feita a pesagem da massa de TCA, às várias diluições que esta sofre desde a sua preparação inicial até à sua utilização como amostras padrão para a calibração. Além destas, a solução-mãe é também transportada desde o departamento de I&D, por vezes mal selada, o que é principalmente preocupante no verão, onde se poderá dar uma maior perda de TCA por evaporação. É aconselhada a calibração dos equipamentos cromatográficos com recurso a padrões preparados, já com as concentrações finais tanto de TCA como de padrão interno, por parte de laboratórios acreditados e certificados, para que exista uma maior certeza na concentração destes. Não existindo esta possibilidade, aconselha-se a utilização de uma solução-mãe preparada por um laboratório certificado, com uma concentração mais baixa que a solução-mãe preparada no I&D, para a incerteza associada às diluições seja reduzida ao máximo.
- Realizar testes às soluções de padrão, diluídas a partir da solução proveniente do I&D, a fim de se verificar ao fim de quanto tempo estas devem deixar de ser utilizadas, e a diluição repetida.
- Deve-se redefinir os pontos da curva de calibração, diminuindo o valor da última concentração, alterando-o de 20 ppt para uma concentração mais próxima de 10 ppt. Esta alteração deve-se ao facto de se verificar que existe maior erro na segunda metade da curva, onde a concentração de pontos é menor, e de o critério máximo de aceitação de qualquer matéria-prima ou produto, ser de 10 ppt. Desta forma, ao se diminuir o último ponto para 12 ppt, diminuir-se-ia a curva em 60%, diminuindo também o seu erro associado.
- Devem ser realizados estudos que permitam definir que parâmetros devem ser tidos em conta na aceitação/rejeição da curva de calibração. Atualmente é tido em conta

o coeficiente de variação da área de padrão interno de amostras brancas e a área do mesmo padrão nas amostras seguintes, das concentrações da curva de calibração, que tem como critério de aceitação um valor máximo de 10%.

Do que foi observado ao longo do trabalho, a variação da área de padrão interno por vezes era acentuada, no entanto, o quociente das áreas de TCA e padrão interno eram constantes, para cada concentração padrão. Significando que, para as mesmas concentrações padrão, quando uma das áreas diminuía/aumentava (TCA ou padrão interno), a área do segundo composto (padrão interno ou TCA) também diminuía/aumentava, mantendo o quociente constante. Desta forma, deve ser tida em conta o quociente destas áreas, e não apenas a área do padrão interno, para aceitar/rejeitar a curva de calibração.

- Realizar testes à degradação da coluna a fim de se verificar quando esta deve ser cortada ou substituída.
- As pontas das macropipetas são reutilizadas sem serem descontaminadas, sendo apenas lavadas com água e secas a 50 °C. Segundo (Capone, et al., 1999), materiais como o plástico conseguem absorver cloroanisóis. Desta forma, poderia ser realizado um estudo a fim de verificar uma possível contaminação, por parte das pontas, de amostras antigas nas amostras seguintes.
- Aconselha-se um maior controlo do processo. Apesar de se realizarem testes interlaboratoriais, os seus resultados são conhecidos bastante tempo depois, podendo já terem ocorrido cortes na coluna ou mudança das soluções padrão, levando a uma nova calibração. Desta forma, as condições sob as quais o teste interlaboratorial foi realizado foram alteradas, inutilizando os resultados deste teste.
- Para o cálculo dos limiares analíticos através do desvio padrão da amostra, as amostras foram fortificadas com uma concentração de 0,2 ppt uma vez que é esta a concentração mínima de contaminação, através das micropipetas e soluções disponíveis no laboratório. Desta forma, o estudo dos limiares analíticos, através deste método, poderia ser repetido com uma concentração inferior, para se verificar se os limiares analíticos serão inferiores.



## BIBLIOGRAFIA

- Almeida, C., et al. 2004.** *Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica*. s.l. : DQB e Centro de Ciências Moleculares e Materiais, FCUL, 2004.
- Álvarez-Rodríguez, ML. 2003.** *Análisis de la producción de 2,4,6-tricloroanisol por hongos filamentosos aislados de corcho*. Espanha : Universidade da Extremadura, 2003.
- Amorim & Irmãos, S.A. 2011.** *Cortiça 2011*. 2011.
- Amorim Cork América. 2007.** *Media Kit*. s.l. : Corticeira Amorim, 2007.
- AOAC. 2002.** *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*. 2002.
- APCOR. 2013.** *Cortiça Cork 2013*. 2013.
- APCOR, Manual Rolhas. 2011.** Ciência 2.0. [Online] 9 de Julho de 2011. [Citação: 11 de Novembro de 2014.] [http://www.ciencia20.up.pt/attachments/article/577/rec\\_5TCA.pdf](http://www.ciencia20.up.pt/attachments/article/577/rec_5TCA.pdf).
- Barbosa, Sara Cristina de Bessa. 2012.** *Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD*. Lisboa : FCUL, 2012.
- Bliesner, David M. e Bliesner, David M. 2006.** *Validating Chromatographic Methods*. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- Boutou, S., Labadie, D. e Chatonnet, P. 2003.** *Simultaneous assay of chlorophenols and chloroanisoles in wines and corks or cork based stoppers – Application in determining the origin of pollution in bottled wines*. s.l. : J. Int. Sci. Vigne Vin 37, 2003.
- Buser, H. R., Zanier, C. e Tanner, H. 1982.** *Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine*. s.l. : J. Agric. Food Chem. 30, 1982.
- Cadahia, E., et al. 2000.** *Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers*. Europ. Food Research Technol. 211 : s.n., 2000.
- Capone, DL, et al. 1999.** *Absorption of chloroanisoles from wine by corks and other materials*. s.l. : Aust. J. Grape Wine Res. 5: 91-98, 1999.
- Carvalho, A. 1989.** *Considerações sobre silvotecnologia em subericultura*. Lisboa : s.n., 1989.
- Catálogo-Amorim, Corticeira. Amorim. [Online] [Citação: 27 de Novembro de 2014.]** <http://www.amorimcork.com/pt/products/catalogue/>.
- Causon, R. 1997.** *Validation of Chromatographic Methods in Biomedical Analysis: Viewpoint and Discussion*. s.l. : Journal of Chromatography B, 1997.
- Chan, Chung Chow, et al. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification.** New Jersey : John Wiley & Sons, Inc.
- Chatonnet, P. 2004.** *Índole, origen y consecuencia de la presencia de anisoles en el mundo vinícola*. Madrid : Fundación para la Cultura del Vino, 2004.
- Coque, Juan José Rubio, et al. 2006.** *Causes and Origins of Wine Contamination by Haloanisoles (Chloroanisoles and Bromoanisoles)*. León, Espanha : INBIOTEC, 2006.
- Cordeiro, Nereida Maria Abano. 1998.** *Fraccionamento da Cortiça e Caracterização dos seus Componentes. Estudo de Possibilidades de Valorização da Suberina*. Aveiro : Universidade de Aveiro, 1998.
- Cork. 2010.** *Cortiça. Cultura, Natureza, Futuro. Cortiça - Matéria-Prima*. [Online] 2010. [Citação: 2 de Dezembro de 2014.] [http://www.realcork.org/userfiles/File/Cortica%20Materia%20Prima\\_PT.pdf](http://www.realcork.org/userfiles/File/Cortica%20Materia%20Prima_PT.pdf).
- Couto, Isabel Amaral. 2013.** *Método para deteção de 2,4,6-TCA por contaminação de gases halogenados de uma superfície emissora de iões positivos*. Lisboa : FCT/UNL, 2013.
- Curtis, RF, et al. 1972.** *2,3,4,6-tetrachloroanisole: association with musty taint in chickens and microbiological formation*. s.l. : Nature 235, 1972.
- Curtis, RF, et al. 1974.** *Chloroanisoles as a cause of musty taint in chickens and their microbiological formation from chlorophenols in broiler house liter*. s.l. : J. Sci. Food. Agr. 25, 1974.

- Demyttenaere, Jan C.R., et al. 2003.** *Favour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction–capillary gas chromatography–mass spectrometry.* Bélgica : Journal of Chromatography A, 1047, 15–20, 2003.
- Dias, J.M.S. 2009.** *Quantificação de Furanos por Cromatografia Gasosa.* Lisboa : Faculdade de Medicina Veterinária, 2009.
- EURACHEM/CITAC, Guia CG 4. 2008.** *Quantifying Uncertainty in Analytical Guide to Method Validation and Related Topics, 2ª Edição.* 2008.
- Fortes, M. A. e Rosa, M. E. 1988.** *Densidade da cortiça: factores que a influenciam.* s.l. : Cortiça nº 593, 1988.
- Fortes, M.A. 1990.** *A cortiça,* Colóqui Ciência 35. 1990.
- Fuller, P. 1995.** s.l. : Aust. N.Z. Wine Ind. J. 10, 58, 1995.
- Gibson, L. J., Esterling, K. E. e Ashby, M. F. 1981.** *Proc. R. Soc. Lon.,* 377. 1981.
- Gil, L. 1999.** *Novas patentes na área da cortiça.* s.l. : Rev. Igenium II Séria nº 34, 1999.
- Gomez-Ariza, J. L., et al. 2006.** *Use of multiple headspace solid-phase microextraction and pervaporation for the determination of off-flavours in wine.* s.l. : J. Chromatogr. A 1112, 2006.
- Graham, K. N., et al. 1996.** *Solid-phase microextraction of the herbicide metolachlor in runoff and tile-drainage water samples.* s.l. : J. Chromatogr. A 725, 1996.
- Griffiths, NM. 1974.** *Sensory properties of chloroanisoles.* s.l. : Chem. Sens. Flavor. 1, 1974.
- Guillemonat, A. 1960.** *Ann. Fac. Sci. Vol. 30, 43.* 1960.
- GUM. 2008.** *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement.* s.l. : Joint Committee for Guides in Metrology - JCGM, 2008.
- Hall, M, Byrd, N e Willians, J. 2004.** *An assessment of the effect of the ROSA treatment on the level of TCA in naturally-contaminated cork granules.* Nova Zelândia : Winemaker 484, 2004.
- Hervé, E, et al. 2000.** *Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural corks.* 2000.
- Holopainen, Sanna, et al. 2013.** *Determination of chlorophenols in water by headspace solid phase microextraction ion mobility spectrometry (HS-SPME-IMS).* Finlândia : Talanta 114, 176–182, 2013.
- Inmetro, DOQ-GCCRE-008. 2003.** *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.* s.l. : Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2003.
- Insa, S., Salvadó, V. e Anticó, E. 2004.** *Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples.* s.l. : Journal of Chromatography A, 1047, 15–20, 2004.
- Insa, Sara, et al. 2007.** *Assessment of the matrix effect on the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) analysis of chlorophenols in wines.* Girona, Espanha : J. Sep. Sci., 30, 722 – 730, 2007.
- Insa, Sara, et al. 2006.** *Ethanol/Water Extraction Combined with Solid-Phase Extraction and Solid-Phase Microextraction Concentration for the Determination of Chlorophenols in Cork Stoppers.* Girona, Espanha : J. Agric. Food Chem., 54, 627-632, 2006.
- IPAC. 2007.** *Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos - OGC007.* Portugal : Instituto Português de Acreditação, 2007.
- Irmãos, Departamento de Investigação & Desenvolvimento - Amorim &. 2014.** *Análise Cromatográfica para Quantificação de TCA.* 2014.
- Jeleń, Henryk H., Dziadas, Mariusz e Majcher, Malgorzata. 2013.** *Different headspace solid phase microextraction – Gas chromatography/mass spectrometry approaches to haloanisoles analysis in wine.* Polónia : Journal of Chromatography A, 1313, 185– 193, 2013.
- Jönsson, S., et al. 2006.** *Determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole on ng/L to pg/L levels in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography-high-resolution mass spectrometry.* Suécia : Journal of Chromatography A, 1111, 71–75, 2006.

- Liese, W., Günzerodt, H. e Parameswaran, N. 1983.** *Alterações biológicas da qualidade da cortiça que afectam a sua utilização.* s.l. : Cortiça Nº 541, 1983.
- Lizagarra, Elena, et al. 2004.** *Determination of chloroanisole compounds in red wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry.* Espanha : Journal of Chromatography A, 1052, 145-149, 2004.
- López-Vidal, S. e Arce, L. 2005.** *Optimisation of a Headspace Solid-Phase Micro- Extraction Procedure for the Determination of 2,4,6-Trichloroanisole and Various Related Compounds in Cork Washing Waste Water by Use of Gas Chromatography-Mass Spectrometry.* Sevilha, Espanha : Chromatographia, 62, 527-531, 2005.
- Lord, H. e Pawliszyn, J. 2000.** *Evolution of Solid Phase Microextraction Technology - Review".* s.l. : J. Chromatogr. A 885, 2000.
- Machado, Ana Rodrigues. 2011.** *Implementação de um Método para a Determinação de Hidrocarbonetos Alifáticos Saturados em Óleo de Girassol por Cromatografia Gasosa.* Lisboa : s.n., 2011.
- Machado, D. P. 1935.** *Contribuição para o estudo da formação da cortiça no sobreiro.* s.l. : Revista Agronómica Vol. 23, 1935.
- McGraw e Hill. 2004.** *Dean's Analytical Chemistry Handbook.* Nova Iorque : Pradyot Patnaik, 2004.
- McNair, Harold M. e Miller, James M. Basic Gas Chromatography.** s.l. : John Wiley & Sons, Inc.
- Miki, A, et al. 2005.** *Identification of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) causing a musty/muddy off-flavor in sake and its production in rice Koji and Moromi mash.* Japão : J. Biosci. Bioengin. 100, 2005.
- Moutinho, Sérgio. 2008.** *Análise sensorial - Uma ferramenta analítica na garantia da inocuidade sensorial das rolhas de cortiça.* s.l. : CTCOR, 2008.
- Natividade, V. 1950.** *Subericultura.* Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Lisboa : Direcção Geral das Florestas, 1950.
- Neto, Paula Vieira, Rocha, Sílvia M. e Silvestre, Armando J.D. 2007.** *Simultaneous headspace solid phase microextraction analysis of off-flavour compounds from Quercus suber L. cork.* Aveiro, Portugal : J. Sci. Food Agric., 87, 632-640, 2007.
- NM Cassiano, JC Barreiro, LRR Martins, RV Oliveira, QB Cass. 2009.** *Validação em Métodos Cromatográficos para a Análise de Pequenas Moléculas em Matrizes Biológicas.* s.l. : Química Nova, 2009.
- Nogueira DQB/FCUL, Profº José Manuel F. Curso de Validação de Métodos Cromatográficos em Harmonização com os Guias Oficiais.** s.l. : Soquímica.
- Nystrom, A, et al. 1992.** *Drinking-water off-flavor caused by 2,4,6-trichloroanisole.* Suécia : Water Sci. Technol. 25, 1992.
- Özhan, Didehan, et al. 2009.** *Determination of Chloroanisoles and Chlorophenols in Cork and Wine by using HS-SPME and GC-ECD Detection.* s.l. : J. Inst. Brew. 115(1), 71-77, 2009.
- Pawliszyn, J. e Arthur, C. L. 1990.** *SPME with thermal desorption using fused silica optical fibers.* s.l. : Anal. Chem. 62, 1990.
- Pereira, H. 1998.** *Chemical composition and variability of cork from Quercus suber L.* s.l. : Wood Science and Technology, Vol. 22, 1998.
- Pereira, H., Rosa, M. E. e Fortes, M. A. 1987.** *The cellular structure of cork from Quercus suber L.* s.l. : IAWA Bulletin n.s. Vol 8, 1987.
- Pfeifer, O. 2002.** *Spurenanalyse halogenierter Phenylmethylether (Anisole) in der aquatischen Umwelt.* Alemanha : Universidade de Ulm, 2002.
- Quercus. 1996.** *Qualitative experiments to determine the components responsible and eliminate the causes of undesirable sensory characteristics in drinks stoppered with cork.* s.l. : European Union and C.E. Liège, 1996.
- Relacre. 2000.** *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química.* s.l. : Relacre, 2000.
- Reynolds, Andrew G. 2010.** *Managing Wine Quality Volume 2: Oenology and Wine Quality.* Cambridge, Reino Unido : Woodhead Publishing Limited, 2010.

- Ribeiro, Isabela. 2008.** *Validação de Métodos - Encontro de Técnicos de Laboratórios de Saúde Pública*. Lisboa : Laboratório de Química e Toxicologia de Águas, 2008.
- Ribéreau-Gayon, P, et al. 2006.** *Handbook of Enology Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2nd edn*. Chichester, UK : John Wiley & Sons, Inc, 2006.
- Ridgway, Kathy. 2012.** *Sample preparation for food contaminant analysis*. s.l. : LCGC Europe, 2012.
- Riu, M., et al. 2002.** *Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solidphase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection*. Espanha : Journal of Chromatography A, 977, 1–8, 2002.
- . **2006.** *Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection*. s.l. : J. Chromatogr. A 1107, 2006.
- Roberto, João Telmo Sousa. 2011.** *Planeamento Logístico de Unidade Industrial Equipar na Amorim & Irmãos, S.A*. Porto : FEUP, 2011.
- Rocha, S., et al. 2006.** *Rapid tool for distinction of wines based on global volatile signature*. s.l. : J. Chromatogr. A 1114, 2006.
- Rood, Dean. 2007.** *The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatography, 4th Edition*. s.l. : Wiley-VCH, 2007.
- SANCO/10684. 2009.** *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*. 2009.
- Saxby, MJ, Reid, WJ e Wragg, GS. 1992.** *Index of Chemical Taints*. UK : Leatherhead Food, 1992.
- Sefton, MA e Simpson, RF. 2005.** *Compounds causing cork taint and the factors affecting they transfer from natural cork closures to wine – a review*. s.l. : Aust. J. Grape Wine Res. 11, 2005.
- Silva, Maria Emília Calvão Moreira. 2010.** *Apontamentos de tecnologia dos produtos florestais. A cortiça - Suas características e propriedades*. Vila Real : UTAD, 2010.
- Socorex. Acura® manual 815/ 825/ 835/ 855.**
- Suprenant, A e Butzke, CE. 1997.** *Implications on sensory quality control of cork stoppers*. In: Henick-Kling T, Woly TE and Harkness EM. Nova Iorque, USA : s.n., 1997.
- Tanner, H., Zanier, C. e Würdig. 1981.** *Zur analytischen differenzierung von muffon und korkgeschmack in wein*. Suíça : s.n., 1981.
- Taylor, M. K., et al. 2000.** *Supercritical fluid extraction of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers*. s.l. : J. Agric. Food Chem. 48, 2000.
- Urruty, L. e Montury, M. 1996.** *Influence of ethanol on pesticide extraction in aqueous solutions by solid-phase microextraction*. s.l. : J. Agric. Food Chem., 44, 3871-3877, 1996.
- Vlachos, P., et al. 2007.** *Matrix effect during the application of a rapid method using HS-SPME followed by GC–ECD for the analysis of 2,4,6-TCA in wine and cork soaks*. Grécia : Food Chemistry, 105, 681–690, 2007.
- Whitfield, F, Hill, J e Shaw, K. 1997.** *2,4,6-tribromoanisole: a potential cause of mustiness in packaged food*. s.l. : J. Agric. Food Chem. 45, 1997.
- Wieser, M e Barglund, M. 2009.** *Atomic weights of the elements 2007*. s.l. : (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem., 2009, 81, 2131-2156, 2009.
- Wood, Roger. 1999.** *How to validate analytical methods*. s.l. : Trends Anal. Chem., 1999. v. 18, p. 624-632.
- Zalacain, A., et al. 2004.** *Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint*. s.l. : J. Chromatogr. A 1033, 2004.



## 7. Anexos

### 7.1. Anexo A – Resultados dos Testes de Linearidade

#### 7.1.1. Anexo A.1.1. Resultados do primeiro teste de linearidade para o ECD1.

Tabela 7.1 - Resultados do primeiro teste de linearidade para o ECD1.

n	0,5			1			2			5			10			20		
	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API
1	0,07	32,0	728,1	1,04	61,0	482,0	2,78	114,4	417,3	4,79	246,1	551,8	9,83	642,0	733,8	23,48	1297,4	636,8
2	0,55	51,8	614,4	1,26	67,7	465,9	1,99	117,2	565,7	5,28	258,7	530,9	10,06	632,7	707,1	21,88	1284,6	675,9
3	0,54	53,1	637,5	1,04	71,9	570,3	1,98	119,8	579,8	4,95	307,8	669,8	9,94	602,5	681,2	21,37	1232,6	663,7
4	0,59	56,4	643,4	1,11	84,3	636,3	2,2	137,3	609,3	4,63	272,9	631,6	10,70	698,8	736,7	20,07	1211,9	693,7
5	0,79	66,0	628,6	0,99	77,9	638,0	2,06	136,8	641,5	5,09	324,7	688,9	9,78	594,9	683,6	21,38	1226,5	659,9
6	0,43	54,2	734,1	0,96	70,1	586,0	2,01	121,7	582,9	5,01	302,6	651,3	10,58	569,3	606,4	21,21	1203,1	652,3
7	0,43	47,6	640,9	1,09	75,6	578,6	2,08	131,4	610,6	4,85	311,6	691,1	10,20	595,9	657,6	20,35	1166,2	658,5
8	0,47	51,5	660,7	1,05	75,4	595,3	2,07	120,0	560,8	5,38	309,5	624,3	10,80	533,6	557,4	21,03	1160,7	634,6
9	0,64	59,8	647,2	1,13	80,6	602,4	1,93	129,4	640,4	5,36	247,7	501,2	11,13	611,3	620,0	20,77	1197,2	662,7
10	0,50	52,4	652,4	0,96	76,3	637,2	2,09	140,9	654,3	5,78	300,1	565,9	10,80	566,8	592,1	20,67	1252,6	696,9
11	0,55	57,2	678,7	1,04	71,2	562,8	2,09	133,1	617,9	5,33	294,5	599,4	10,75	609,0	638,9	21,65	1194,9	635,2
12	0,43	45,9	620,1	1,03	70,3	559,8	2,23	112,3	493,2	5,09	263,8	560,0	10,04	640,4	717,2	21,96	1184,2	620,7
13	0,52	52,7	643,8	1,05	80,9	634,7	2,13	122,6	558,9	5,68	225,6	432,7	10,40	660,1	714,7	20,64	1152,3	641,9
14	0,33	47,3	717,6	1,34	93,1	612,2	2,35	149,8	630,6	5,06	335,5	715,5	10,76	668,5	701,1	22,35	1246,4	642,1
15	0,47	51,3	663,1	nd	-	693,9	2,35	130,2	547,4	5,33	243,7	495,6	10,19	582,3	643,0	21,53	1216,2	650,0
16	0,40	46,3	648,6	0,95	63,2	533,2	2,14	110,6	502,4	5,22	261,6	542,5	10,36	666,8	725,1	21,59	1302,9	694,5
17	0,46	49,1	636,0	1,01	72,7	586,7	2,04	113,4	536,9	5,02	255,6	549,3	11,68	640,2	620,0	21,28	1262,0	682,1
18	0,42	44,8	612,0	1,11	81,3	616,2	2,27	65,6	414,3	5,42	289,2	579,6	10,69	639,2	674,3	22,14	1061,4	528,5
19	0,48	50,3	638,1	1,12	74,4	559,7	2,34	135,7	572,7	4,88	253,5	559,9	11,18	608,4	614,7	19,60	992,4	581,3
20	0,52	51,0	619,8	1,29	93,1	632,3	2,05	117,6	554,5	5,00	307,2	662,8	10,30	653,1	714,0	22,41	1259,1	647,1

#### 7.1.2. Anexo A.1.2. Resultados do primeiro teste de linearidade para o ECD2.

Tabela 7.4 - Resultados do primeiro teste de linearidade para o ECD2.

n	0,5			1			2			5			10			20		
	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API
1	0,54	85,4	2816,7	1,05	177,5	2487,4	2,14	324,9	2040,4	5,23	920,1	2260,4	9,77	1658,5	2148,8	23,08	3523,1	1912,9
2	0,56	96,3	3000,0	1,08	186,3	2531,1	2,04	305,0	2024,9	5,20	1015,8	2508,3	9,94	1850,2	2354,9	21,16	3582,0	2122,6
3	0,53	84,5	2843,4	1,09	185,2	2476,6	2,07	268,1	1754,0	5,00	1023,0	2631,7	10,46	1665,8	2021,0	21,82	3596,0	2065,6
4	0,54	78,2	2615,0	1,07	167,3	2307,3	2,15	267,2	1675,2	5,05	960,7	2447,6	9,92	1593,1	2031,2	21,94	3786,4	2163,1
5	0,55	88,1	2866,2	1,09	163,7	2208,8	2,17	319,9	1986,8	5,04	933,5	2380,1	10,45	1897,6	2294,4	20,84	3725,6	2241,7
6	0,65	91,9	2348,9	1,20	182,6	2198,5	2,31	338,6	1959,3	5,60	896,6	2050,8	10,55	2023,7	2423,9	20,90	3735,4	2241,3
7	0,51	66,9	2404,7	1,12	161,8	2096,9	2,28	283,1	1663,6	5,26	864,1	2181,7	9,95	1647,2	2093,5	22,30	3916,2	2200,6
8	0,55	75,4	2425,7	1,04	146,7	2073,2	2,18	307,7	1895,9	4,89	876,7	2308,1	10,79	1916,9	2244,2	21,92	3632,4	2071,5
9	0,56	81,3	2579,3	1,00	142,1	2108,0	2,23	281,6	1695,5	5,26	870,4	2125,1	10,38	1802,1	2194,2	22,56	3714,2	2063,0
10	0,52	78,4	2751,3	1,14	148,3	1895,1	2,18	301,8	1863,8	5,68	1038,1	2341,0	9,61	1496,3	1970,5	21,37	3818,1	2240,4
11	0,52	72,0	2491,3	1,10	167,6	2228,3	2,33	314,9	1812,3	5,37	994,8	2375,1	10,50	1785,5	2149,0	21,69	3621,2	2093,1
12	0,50	70,1	2582,4	1,02	166,4	2422,4	2,32	325,0	1874,8	5,44	934,1	2202,7	10,04	1721,4	2168,7	21,22	3589,2	2121,1
13	0,49	66,0	2512,0	1,04	159,2	2268,6	2,12	308,0	1955,9	5,62	1105,0	2519,6	11,43	2047,0	2259,7	20,58	3541,3	2158,2
14	0,60	91,5	2615,7	1,02	157,8	2285,9	2,05	279,5	1841,8	5,14	752,8	1883,5	11,18	1981,5	2237,9	21,30	3720,7	2190,5
15	0,51	71,6	2599,0	0,99	150,6	2268,2	2,09	300,8	1943,0	5,35	907,9	2178,7	10,31	1979,6	2427,1	20,62	2997,8	1811,2
16	0,57	81,3	2469,5	1,26	201,5	2293,0	2,27	318,6	1878,6	4,84	827,3	2200,4	9,83	1895,6	2439,1	21,84	3588,4	2060,1
17	0,53	75,3	2567,8	1,18	182,8	2242,0	2,14	296,8	1873,5	5,26	927,5	2263,2	10,85	1864,6	2170,2	20,64	3657,2	2222,3
18	0,58	86,9	2620,8	1,22	178,7	2120,6	2,30	344,0	2005,3	5,25	895,9	2129,1	9,97	1814,3	2300,7	21,51	3381,0	1970,4
19	0,52	80,2	2773,2	1,39	219,8	2236,5	2,17	292,7	1817,5	5,15	910,1	2269,3	10,82	1632,9	1906,9	22,31	2891,3	1624,2
20	0,60	89,5	2666,2	1,12	167,7	2339,4	2,52	320,9	1692,4	5,17	834,8	2074,5	11,00	1941,3	2228,9	21,74	3829,9	2208,5

### 7.1.3. Anexo A.2.1. Resultados do segundo teste de linearidade para o

#### ECD1

Tabela 7.7 - Resultados do segundo teste de linearidade para o ECD1.

n	0,5			1			2			5			10			20		
	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API
1	0,68	50,1	694,1	0,92	61,3	645,7	1,98	134,9	697,5	4,11	275,6	700,7	8,84	582,0	696,8	19,64	995,3	539,3
2	0,71	48,5	647,9	0,91	52,0	554,7	2,34	158,3	696,4	4,88	304,8	654,9	10,42	638,2	649,0	20,62	983,2	507,5
3	0,75	51,7	654,2	0,93	57,9	605,2	2,21	123,0	572,1	5,05	332,3	690,4	9,73	658,5	717,3	19,31	879,7	484,8
4	0,73	48,7	632,6	1,03	61,1	580,3	2,31	124,5	554,0	4,91	277,9	593,9	10,22	638,6	662,0	20,09	1042,2	552,3
5	0,81	55,6	660,2	0,89	55,4	602,3	2,23	110,3	506,9	4,76	347,0	765,0	10,45	628,0	636,9	20,24	996,5	524,2
6	0,68	48,9	676,1	1,24	83,1	668,6	2,21	123,0	570,2	4,52	334,9	777,4	9,88	610,1	654,1	20,80	1080,6	553,1
7	0,68	47,5	655,2	1,19	87,4	730,7	2,21	112,0	521,3	5,24	343,9	690,0	9,71	602,8	657,4	20,07	1187,1	629,6
8	0,69	44,6	608,4	1,34	89,7	668,9	2,56	140,0	563,4	4,93	357,4	760,8	9,84	647,3	589,3	20,83	1066,9	545,4
9	0,57	37,8	608,7	1,28	89,1	693,1	2,40	132,9	570,0	4,67	362,3	813,1	9,61	545,8	601,6	19,90	1108,0	592,6
10	0,59	42,0	656,6	1,40	93,9	675,2	2,72	143,3	544,3	5,17	343,4	697,5	10,15	575,4	600,5	19,66	1006,5	544,9
11	0,52	37,5	656,7	1,05	75,6	706,2	2,20	109,1	508,4	4,99	310,4	653,4	10,30	643,8	662,4	19,85	1041,0	558,2
12	0,59	41,4	649,4	1,17	84,9	717,2	2,03	100,6	507,9	5,04	324,1	675,5	10,03	567,8	599,9	20,43	1179,2	614,5
13	0,57	47,7	662,7	1,10	84,4	758,0	2,27	110,3	500,0	4,41	310,5	737,3	9,32	556,2	632,0	20,15	1058,5	559,3
14	0,59	44,7	706,0	1,17	83,0	704,9	2,07	104,4	516,8	4,52	318,1	737,7	9,95	600,4	639,1	19,76	1143,4	615,9
15	0,59	43,5	677,3	1,07	80,1	738,0	2,26	110,7	502,5	4,57	335,0	758,5	10,81	646,0	633,7	20,49	1084,2	563,3
16	0,49	40,3	739,3	1,2	81,0	671,0	2,02	106,1	537,1	4,37	339,0	792,6	10,10	619,9	650,2	19,49	973,8	531,8
17	0,62	47,0	710,2	1,11	79,3	704,8	1,96	102,3	534,0	4,76	331,4	731,2	9,81	704,5	704,5	20,05	1006,3	534,2
18	0,81	56,0	666,1	1,15	73,5	631,2	1,86	103,4	566,2	4,45	335,8	791,6	10,63	594,0	592,4	19,57	1073,4	583,8
19	0,63	50,7	750,6	1,17	83,0	702,8	-	-	576,0	4,57	327,4	751,5	10,12	574,8	602,2	19,62	1192,0	607,0
20	0,64	40,8	600,4	1,23	73,9	597,7	2,32	130,0	577,0	4,61	326,4	742,1	9,90	559,7	599,2	20,10	1022,5	541,4

### 7.1.4. Anexo A.2.2. Resultados do segundo teste de linearidade para o

#### ECD2

Tabela 7.10 - Resultados do segundo teste de linearidade para o ECD2

n	0,5			1			2			5			10			20		
	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API
1	0,51	229,3	30646,8	0,83	1859,9	44728,1	1,59	2636,4	21588,4	3,32	7462,0	24294,9	9,67	23606,5	23972,2	20,44	12376,7	5798,0
2	0,52	294,6	36351,3	0,81	1940,0	48726,6	1,56	3274,0	27304,9	3,53	7659,7	23214,2	9,43	20020,3	20865,9	20,74	15383,8	7097,4
3	0,52	287,7	34731,4	0,91	2301,9	46258,5	1,49	3898,3	34826,3	3,36	7487,7	23997,1	9,15	20147,8	21662,1	23,45	17364,8	7068,7
4	0,52	315,1	38501,7	0,81	1849,0	47015,1	1,65	3501,2	27089,4	3,52	8090,6	24625,0	9,80	19663,1	19683,0	22,11	16582,4	7168,2
5	0,59	468,9	28840,4	0,84	2072,6	48492,2	1,57	3821,8	31845,9	3,69	10102,5	29130,5	9,48	21734,1	22524,2	22,94	20809,6	8663,6
6	0,50	132,9	22308,5	0,95	2749,4	50701,3	1,41	3329,7	32203,3	3,54	7393,7	22367,5	9,63	19136,3	19486,0	25,13	23693,0	8990,2
7	0,51	199,2	25920,6	0,97	2494,6	44293,9	1,49	3619,3	32287,4	3,61	9106,4	26954,9	9,08	7027,8	7616,5	25,12	25604,3	9718,2
8	0,52	321,1	36317,9	0,93	2475,0	47285,0	1,38	3139,9	31239,7	3,77	7245,8	20417,9	8,69	9364,7	10629,4	25,56	20967,8	7819,1
9	0,53	332,2	34388,9	0,84	1799,7	41920,2	1,47	4190,0	38271,2	3,53	9616,2	29119,9	9,02	11555,4	12611,6	24,53	21356,8	8304,5
10	0,52	297,8	35597,5	0,82	1534,9	37773,0	1,55	4446,0	37455,9	3,51	10118,0	30862,9	9,81	11084,1	11084,2	25,01	22158,2	8448,7
11	0,53	350,0	35356,4	0,85	1623,9	36954,9	1,44	3524,9	33204,0	3,60	8280,6	24540,3	9,62	11663,3	11898,1	25,03	20444,4	7789,1
12	0,51	373,1	36401,1	0,83	1359,1	32816,5	1,44	3726,0	34991,0	3,69	8370,8	24142,0	8,64	9158,1	10460,5	26,03	21851,2	7998,5
13	0,54	364,0	35771,8	0,84	1669,7	39386,5	1,54	4200,5	35698,0	3,39	8505,7	26995,9	9,86	10289,7	10236,9	26,11	24386,4	8899,3
14	0,51	274,5	37196,3	0,80	1256,7	32618,0	1,39	3272,0	32353,3	3,40	7656,1	24214,6	10,24	10117,4	9673,7	26,86	25432,7	9018,6
15	0,51	285,5	40136,3	0,86	1838,5	41185,8	1,50	3748,4	33293,6	3,21	6709,3	22661,8	9,77	10968,7	11010,0	25,16	30017,9	11105,3
16	0,49	220,1	40781,8	0,83	1542,9	36740,0	1,44	3061,5	28657,5	3,13	5923,9	20639,5	9,77	10957,9	11008,0	28,68	25265,6	8382,1
17	0,49	193,7	37514,3	0,82	1710,5	42314,6	1,41	3310,0	32066,8	3,57	9664,2	28969,0	8,90	4353,6	4818,9	25,06	20072,1	7636,3
18	0,50	271,9	41655,7	0,85	1896,3	43828,4	1,41	2180,4	21044,2	3,47	10735,7	33255,4	9,34	5467,5	5756,5	29,59	27816,0	8939,8
19	0,50	235,4	36993,4	0,87	1876,0	40777,1	1,43	2121,6	20119,2	3,30	9044,9	29679,6	9,31	6590,3	6959,8	25,96	28643,1	10515,3
20	0,51	284,9	41186,4	0,83	1345,3	32814,3	1,55	2195,9	18578,3	3,53	6890,9	20913,5	9,21	6143,0	6560,5	21,97	35634,2	15502,8

## 7.1.5. Anexo A.3.1. Resultados do terceiro teste de linearidade para o

### ECD1

Tabela 7.13 - Resultados do terceiro teste de linearidade para o ECD1.

n	0,5			1			2			5			10			20		
	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API
1	0,43	24,2	875,7	1,12	68,7	844,3	2,10	111,5	712,2	4,97	329,4	870,9	9,39	673,0	935,9	19,85	1149,2	753,5
2	0,62	36,4	853,1	1,05	62,4	824,5	2,25	126,2	749,0	4,70	294,4	824,5	9,83	668,1	887,5	20,55	1157,2	732,8
3	0,62	36,3	849,3	1,04	60,4	809,6	2,08	107,2	691,4	4,79	289,5	795,4	9,83	642,8	854,4	20,06	1126,8	731,2
4	0,54	28,6	778,5	1,05	65,3	860,0	2,16	112,3	695,6	4,68	304,9	856,5	10,09	690,2	893,2	20,11	1203,2	778,7
5	0,56	31,8	833,3	1,05	64,5	855,2	2,14	115,2	720,3	4,82	323,7	883,9	9,83	668,4	888,2	19,60	1071,8	711,9
6	0,47	28,1	900,8	1,01	62,5	859,0	2,05	104,7	683,6	4,58	316,8	910,9	9,35	629,0	878,8	19,74	1161,9	766,2
7	0,42	23,8	886,7	1,02	61,9	842,1	2,08	109,7	705,6	4,96	340,6	902,4	9,55	671,7	918,4	19,90	1136,4	743,4
8	0,43	23,4	828,7	1,02	61,7	842,1	2,20	111,8	681,7	4,98	313,4	827,1	9,34	645,6	903,2	19,40	1078,6	723,8
9	0,45	22,9	776,2	1,02	68,2	924,9	2,15	110,8	691,1	4,67	345,1	973,5	10,05	642,5	835,2	20,52	1189,2	754,1
10	0,94	51,2	760,6	1,00	62,5	865,0	2,05	107,1	701,0	4,90	336,3	902,6	9,69	643,1	867,2	19,97	1114,1	725,9

## 7.1.6. Anexo A.3.2. Resultados do terceiro teste de linearidade para o

### ECD2

Tabela 7.16 - Resultados do terceiro teste de linearidade para o ECD2.

n	0,5			1			2			5			10			20		
	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API
1	0,52	139,0	3329,8	0,98	328	4082,2	2,01	570	3391,8	4,89	1714,2	4162,5	9,78	4241,1	5139,7	20,77	2912,4	1658,7
2	0,49	173,2	4411,8	1,06	293,0	3340,3	2,06	541,7	3149,3	4,57	1546,8	4023,4	10,09	3742,9	4394,0	20,13	3045,6	1790,5
3	0,49	174,7	4438,0	1,05	363,4	4211,3	2,02	533,0	3168,6	4,75	1601,7	4010,2	10,08	3777,0	4439,4	20,96	3034,5	1712,6
4	0,51	140,1	3428,6	1,00	315,2	3833,7	2,07	720,5	4165,7	4,91	1752,7	4237,4	10,13	3799,6	4444,0	21,00	3042,7	1714,1
5	0,50	134,5	3386,5	1,01	343,7	4132,6	1,99	579,5	3489,2	4,84	2537,4	6225,8	10,31	4159,8	4779,5	20,49	2725,0	1573,5
6	0,49	161,3	4079,4	1,01	341,4	4120,2	1,99	588,3	3535,3	4,99	2368,8	5644,6	9,98	4188,5	4970,7	20,50	2947,6	1701,1
7	0,52	189,2	4513,5	0,94	307,8	3994,4	1,93	588,0	3647,0	4,76	2205,3	5509,2	9,97	3387,0	4024,9	19,99	3263,4	1931,4
8	0,55	170,3	3878,1	0,94	299,1	3866,9	2,12	645,9	3653,9	4,96	2247,7	5386,2	9,92	4124,8	4925,4	18,82	3128,0	1867,7
9	0,52	168,0	4029,3	1,02	277,4	3202,8	1,92	626,0	3912,4	5,04	2153,8	5075,0	9,94	3994,2	4761,2	20,34	3038,3	1767,6
10	0,47	176,8	4734,2	1,04	283,0	3313,0	1,96	567,7	3469,4	5,06	2426,7	5701,3	10,69	2503,6	2774,5	20,70	3014,1	1722,6

## 7.1.7. Anexo A.4.1. Resultados do quarto teste de linearidade para o

### ECD1

Tabela 7.19 - Resultados do quarto teste de linearidade para o ECD1.

n	0,5			1			2			5			10			20		
	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API
1	0,39	80,9	1615,5	0,35	56,3	1225,9	1,43	197	1205,3	3,67	594,8	1461,1	8,13	1276,3	1429,8	18,56	2138,2	1054,1
2	0,34	73,1	1612,9	0,38	66,7	1335,5	1,53	219,4	1257,5	3,44	554,5	1449,1	8,40	1164,4	1261,9	16,49	1950,5	1081,8
3	0,21	49,3	1622,5	0,79	125,2	1338,3	1,40	199,6	1246,1	3,45	564,2	1470,5	8,22	1110,1	1230,2	17,90	2163,3	1105,5
4	0,39	78,6	1568,6	0,71	113,8	1335,1	1,48	202,5	1193,9	3,58	573,4	1441,3	8,41	1232,0	1334,3	16,84	2237,9	1215,6
5	0,33	69,4	1561,6	0,68	112,4	1376,2	1,62	215,2	1165,7	3,60	598,1	1494,8	8,16	1138,4	1269,9	17,50	2039,7	1066,4
6	0,38	71,6	1462,3	0,74	121,0	1359,1	1,56	209,5	1178,4	3,82	574,2	1354,4	8,13	1097,4	1228,6	17,37	2127,9	1120,7
7	0,33	66,8	1538,2	0,67	108,0	1333,7	1,57	216,7	1213,5	3,30	545,0	1483,2	8,39	1146,3	1244,2	19,13	2258,9	1080,6
8	0,26	51,3	1419,3	0,60	99,5	1349,7	1,67	234,8	1236,5	3,47	525,7	1364,0	7,85	972,3	1127,1	19,63	2510,7	1170,6
9	0,31	59,0	1408,2	0,62	105,0	1387,6	1,56	210,6	1183,6	3,08	497,2	1446,9	8,27	1104,8	1215,9	18,37	2431,1	1211,3
10	0,26	54,6	1489,8	0,70	115,9	1367,8	1,64	225,5	1205,5	3,51	566,5	1452,0	7,50	1011,2	1226,0	18,77	2386,7	1163,6

## 7.1.8. Anexo A.5.1. Resultados do quinto teste de linearidade para o ECD1

Tabela 7.22 - Resultados do quinto teste de linearidade para o ECD1.

n	0,5			1			2			5			10			20		
	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API	[TCA]	ATCA	API
1	0,54	13,0	742,0	0,97	42,7	863,7	2,10	106	797,3	4,98	314,2	904,3	10,02	573,4	794,7	19,51	1049,7	735,8
2	0,52	15,0	928,5	0,99	43,9	864,6	2,06	104,0	799,6	4,84	273,3	811,8	10,04	580,0	801,9	19,39	1145,4	807,7
3	0,51	14,0	918,4	0,97	43,7	891,0	1,92	88,2	738,2	4,70	273,2	836,8	9,97	525,7	732,4	19,99	1138,9	778,7
4	0,51	14,7	996,2	1,10	44,9	763,3	2,06	102,7	788,7	4,92	291,0	848,3	10,08	580,4	799,4	19,91	1155,3	793,2
5	0,55	16,0	892,8	0,93	42,1	913,6	1,80	85,2	770,3	5,15	283,1	787,1	10,71	583,0	754,0	19,39	857,9	604,9
6	0,56	16,1	852,9	0,92	42,8	945,8	1,88	87,3	747,7	4,95	283,4	820,7	10,27	587,7	794,3	19,55	1120,2	783,5
7	0,60	19,1	881,1	1,06	55,2	980,2	1,97	94,0	763,2	5,12	305,3	854,0	10,34	563,3	755,7	19,60	1061,1	740,1
8	0,59	17,3	839,5	1,09	52,9	907,9	2,05	94,7	731,0	4,86	284,5	841,6	10,59	600,8	786,2	20,11	1111,4	755,3
9	0,59	18,4	880,9	0,97	42,5	859,3	2,05	100,7	775,7	4,94	290,8	845,2	10,10	580,1	796,8	20,52	1116,6	743,4
10	0,54	15,3	898,0	1,08	55,3	956,9	2,09	97,4	737,0	4,83	274,8	818,0	10,14	566,8	775,6	20,07	1088,3	741,3

## 7.2. Anexo B – Resultados dos Testes dos Limiares Analíticos Através do Desvio Padrão da Amostra

Tabela 7.25 - Resultados dos testes dos limiares analíticos através do desvio padrão da amostra

n	ECD1	ECD2
1	0,25	0,23
2	0,25	0,22
3	0,24	0,24
4	0,19	0,23
5	0,20	0,23
6	0,22	0,21
7	0,29	0,19
8	0,26	0,25
9	0,20	0,20
10	0,22	0,25

## 7.3. Anexo C – Resultados dos Testes da Precisão Intermédia

Tabela 7.26 - Resultados dos testes da precisão intermédia.

n	ECD1		ECD 2	
	Amostra A	Amostra B	Amostra A	Amostra B
1	2,52	10,55	1,98	8,93
	2,57	10,03	1,98	9,36
	2,58	9,24	1,99	10,9
	3,11	9,52	2,19	10,04
2	2,81	9,63	2,09	9,26
	2,73	9,37	1,99	9,56
	2,86	8,57	1,89	9,76
	2,59	8,81	1,94	9,13
3	2,82	8,47	1,93	9,65
	2,52	9,63	2,01	9,40
	2,96	9,44	1,95	8,68
	2,45	9,84	1,96	9,82
4	3,48	9,60	1,98	9,6
	2,60	9,59	1,95	9,24
	3,64	10,17	1,93	9,29

## 7.4. Anexo D – Resultados dos Testes da Robustez

### 7.4.1. Anexo D.1. Resultados do primeiro teste de robustez

Tabela 7.29 - Resultados do primeiro teste de robustez.

n	Ensaio A	Ensaio B	Ensaio C	Ensaio D	Ensaio E	Ensaio F	Ensaio G	Ensaio H
1	1,07	1,20	1,06	1,08	0,94	1,22	1,25	1,02
2	1,07	1,29	1,13	0,90	0,96	1,28	1,11	1,04
3	1,14	1,30	1,34	1,05	1,10	1,18	1,14	1,03
4	1,07	1,26	1,33	1,03	1,24	1,16	1,22	1,10
5	1,19	1,25	1,13	1,13	1,18	1,14	1,35	1,05
6	1,24	1,06	1,26	0,92	1,22	1,42	1,32	-
7	1,08	1,11	1,19	1,19	1,10	1,06	1,29	0,91
8	1,16	1,07	1,32	0,99	1,29	1,06	1,31	0,84
9	1,18	1,18	1,02	1,07	1,18	1,31	1,33	1,19
10	1,24	1,04	1,39	1,04	1,12	1,09	1,33	1,08

## 7.4.2. Anexo D.2. Resultados do segundo teste de robustez

Tabela 7.32 - Resultados do segundo teste de robustez.

<b>n</b>	<b>Ensaio A</b>	<b>Ensaio B</b>	<b>Ensaio C</b>	<b>Ensaio D</b>	<b>Ensaio E</b>	<b>Ensaio F</b>	<b>Ensaio G</b>	<b>Ensaio H</b>
<b>1</b>	2,86	4,09	3,80	2,71	4,53	3,66	3,66	4,23
<b>2</b>	2,64	4,26	3,87	2,99	3,59	3,45	3,64	3,63
<b>3</b>	2,63	4,42	4,48	2,83	4,39	3,76	3,32	3,44
<b>4</b>	3,01	3,48	3,63	3,06	3,91	3,14	3,52	3,42
<b>5</b>	2,77	3,81	3,94	3,22	3,57	3,78	3,70	3,05
<b>6</b>	2,74	4,12	3,82	3,63	3,34	3,37	3,99	4,03
<b>7</b>	3,41	3,85	3,45	3,43	3,66	3,94	3,76	3,37
<b>8</b>	4,14	3,38	3,46	3,38	3,20	3,58	3,75	3,75
<b>9</b>	3,66	4,01	4,03	3,30	3,78	3,50	3,72	4,85
<b>10</b>		3,51	4,18	3,48	2,72	3,86	3,93	3,20